



Systèmes de détection multiparamétrique de marqueurs biologiques ou de polluants, appliqués au diagnostic et au contrôle environnemental

Cloé Desmet

► To cite this version:

Cloé Desmet. Systèmes de détection multiparamétrique de marqueurs biologiques ou de polluants, appliqués au diagnostic et au contrôle environnemental. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT: 2013LYO10149 . tel-01169930

HAL Id: tel-01169930

<https://theses.hal.science/tel-01169930>

Submitted on 30 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
Et L'ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES SANTE

Pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Spécialité BIOCHIMIE

Soutenue publiquement le 18 septembre 2013

par
Cloé DESMET

Systèmes de détection multiparamétrique de marqueurs biologiques ou
de polluants, appliqués au diagnostic et au contrôle environnemental

JURY :

Dr. Patrice N. MARCHE	Président
Prof. Francesco Saverio ROMOLO	Rapporteur
Dr. François ROSSI	Rapporteur
Prof. Loïc J. BLUM	Directeur de thèse
Dr. Christophe A. MARQUETTE	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

L'ensemble des travaux constituant cette thèse a été réalisé :

Sous la direction du Professeur Loïc Blum, et l'encadrement du Docteur Christophe Marquette
Dans l'équipe **Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires**



De l'**Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires**



UMR 5246 – Université Lyon 1 – CNRS – INSA Lyon – CPE Lyon
Bâtiment Curien
43 Bd du 11 novembre 1918
69 622 VILLEURBANNE Cedex France

Au sein de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé



En partie à l'aide du financement du projet de recherche Européen FP7-BONAS



Remerciements

A l'issue de ces trois ans de thèse, il me faudrait quelques centaines de pages supplémentaires afin de pouvoir exprimer justement ma gratitude et mes remerciements à tous ceux qui m'ont accompagnée dans cette étape. Néanmoins, souhaitant que ces remerciements puissent être lus par ceux qui sont concernés (et pour des soucis d'économie de papier, ma façon de remercier aussi la planète) je vais tenter d'être brève.

Merci tout d'abord aux rapporteurs, le Dr. François Rossi et le Prof. Francesco Saverio Romolo, pour leur lecture et retour sur ma thèse avant la soutenance, et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux. J'en profite pour remercier François Rossi également pour l'opportunité qu'il m'offre de travailler dans son équipe pour les 3 ans à venir. Merci également au président du jury et examinateur de ma thèse, le Dr. Patrice Marche, pour ses questions et remarques.

Je souhaiterais évidemment remercier l'ensemble de l'équipe GEMBAS pour ces années partagées.

Le Prof. Loïc Blum pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour avoir été un directeur bienveillant tout au long de la thèse, pour m'avoir poussée, encouragée et rassurée quand j'en ai eu besoin, et pour son accessibilité qui ne le rend que plus estimable.

Le Dr. Christophe Marquette pour son encadrement, pour avoir été présent tout en m'accordant l'autonomie liée à sa confiance, pour son éclairage avisé sur de nombreuses questions, pour ses conseils, relectures et corrections, pour avoir su me pousser à dépasser certaines inquiétudes, pour m'avoir accompagnée tout au long de cette thèse avec bonne humeur et humour. Sans être très expansif, il n'en a pas moins été le meilleur encadrant qu'on puisse avoir.

Les membres du groupe « biopuces » et notamment Gaëlle, avec qui j'ai toujours pu beaucoup échanger, même depuis qu'elle nous a laissé pour le MIT (tu es toujours un peu mon modèle quand même), Céline, qui est certainement l'une des personnes les plus agréables que je connaisse, avec qui il est toujours appréciable de discuter de tout, et Ophélie, avec qui j'ai partagé bien plus qu'un bureau ou la préparation d'un pot, ainsi que bien sûr Benjamin, Guillaume, Stéphanie et Marine pour tous les bons moments.

Les stagiaires, thésards et post-docs du laboratoire, Sofiène, avec qui j'ai eu le plaisir de traverser les étapes M2, thèse et école d'été, Samuel et Julie mais aussi ceux qui sont déjà partis, Joe, Mourad, Mohsine, Fatima, Cyrielle et les autres.

Et bien sûr tous les autres membres du GEMBAS, Fred, Agnès, Béatrice, Bastien, Agnès, et Ofélia, pour leur grande gentillesse, leur bonne humeur et leur soutien.

Merci à tous pour ces quatre années. Si je suis si triste de vous quitter c'est parce que vous avez fait de chaque jour de travail un moment de plaisir.

Je remercie également ceux qui m'ont accompagnée d'une façon où d'une autre dans cette thèse. Merci à Carole Chaix et Daniel Hartmann pour leur participation à mon comité de suivi de thèse. A Gabriel et Carole pour leur aide en microscopie électronique. A Antonio Palucci et Adriana Puiu pour leur aide pour les analyses en composantes principales. A l'ensemble des membres du projet européen BONAS. Aux doctorants et post-doctorants rencontrés à Ascot et en congrès, Paula, Guillermo, Bruno, Anna et tous les autres. Sans oublier à Sylvie Ricard-Blum car c'est aussi grâce à elle que je me suis orientée vers la biochimie en début de cursus et vers la recherche quelques années plus tard, et que j'ai pu faire mon stage de master dans ce laboratoire, merci beaucoup pour tout ça.

Mes remerciements vont aussi bien sûr à ma famille, en commençant par mes parents sans qui je ne serais pas arrivée jusque là, qui m'ont toujours poussée à faire mieux et que j'ai toujours voulu rendre fiers, par Nina pour son oreille attentive, son soutien, ses encouragements et tout le reste, ainsi qu'à Jimi et Lola évidemment pour les petits moments de détente du weekend. A ma grand-mère Léone pour avoir toujours voulu me rendre la vie plus facile, pour être une personne si généreuse et entière, ainsi qu'à Norbert pour être si gentil avec moi. A mes grands-parents André et Ingrid pour avoir toujours beaucoup échangé, pour m'avoir poussée et conseillée, je n'aurais peut-être pas fait cette thèse dans ce laboratoire sans ton implication papet. Merci à tous, avoir soutenu ma thèse devant vous en a vraiment fait un plus grand moment, et je suis fière de vous avoir rendus fiers. Merci également à Patrick et Chantal, qui font partie de ma famille depuis quelques temps maintenant, merci pour ces moments de partage. Une pensée encore à César, à Julien, à Michou, Gaby et Julien, à Marc, et à Sandra.

Merci aussi à mes amis, et en premier lieu à Eve, Aurélie et Caro, avec qui j'ai tant partagé, à très bientôt en Italie pour poursuivre nos longues conversations avec un verre de Chianti ! A Marion, à qui je souhaite toute la réussite possible pour la suite de la thèse, et pour tout le reste... A Emilie, la meilleure partenaire de « course à pied en discutant » possible. A Magalie et Geoffrey ainsi qu'à Cécilia, que j'espère revoir bientôt. Et à tous ceux qui ne sont pas cités mais que je n'oublie pas. Une pensée également à mes camarades de M2 qui seront à leur tour Docteur dans quelques semaines ou quelques mois, je vous souhaite beaucoup de succès pour la suite.

Merci enfin à Vincent. Pour m'avoir chaque jour écoutée, conseillée, poussée, remotivée, rassurée, et réconfortée. Pour m'avoir toujours amenée à donner le meilleur. Pour avoir partagé avec moi chaque étape, les plus délicates comme les plus heureuses. Pour avoir su me donner confiance. Pour ta présence, pour ton soutien, et pour ton amour. Pour tout.

Grâce à vous, ces années de thèse n'ont pas été une tâche solitaire mais une aventure partagée. Et si je suis heureuse de ce qu'elle m'a apporté sur le plan professionnel, je ne le suis pas moins d'avoir vécu ces moments avec vous. Alors encore une fois, merci.

Abréviations

2,4,5-T	acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique
2,4-D	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
4-BBA	acide 4-benzoylbenzoïque
ADN	acide désoxyribonucléique
AFM	microscopie à force atomique, <i>atomic force microscopy</i>
AFP	alpha-fœto protéin
ANN	réseaux neuronaux artificiels, <i>artificial neural network</i>
ASP	toxine amnésiante, <i>amnesic shellfish poisoning</i>
ATP	adénosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BONAS	<i>bomb factory detection by networks of advanced sensors</i>
BSA	albumine de sérum bovin, <i>bovin serum albumin</i>
CCD	dispositif à transfert de charge, <i>charged coupled device</i>
CEA	antigène carcino-embryogénique, <i>carcinoembryogenic antigen</i>
CFH	facteur du complément H, <i>complement factor H</i>
CMA	4-carboxyméthylaniline
CRD	<i>component-resolved diagnosis</i>
cTnI	troponine cardiaque I, <i>cardiac troponin I</i>
DAPA	<i>DNA array to protein array</i>
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane
DNT	dinitrotoluène
DSP	toxine diarrhéïque, <i>diarrheic shellfish poisoning</i>
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDX	énergie dispersive de rayons X
EGFR	récepteur au facteur de croissance épidermique, <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	dosage immuno-enzymatique, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	agence de protection de l'environnement, <i>environmental protection agency</i>
EPO	érythropoïétine
FABP	protéine de liaison aux acides gras, <i>fatty-acid binding protein</i>
GST	glutathion S-transférase
hAGT	O6-alkylguanine-ADN transférase humaine, <i>human O6-alkylguanine-DNA transferase</i>
HBP	hyperplasie bénigne de la prostate
HCA	analyse par cluster hiérarchique, <i>hierarchical clustering analysis</i>
HCC	carcinome hépato-cellulaire, <i>hepatocellular carcinoma</i>
HMTD	hexaméthylène triperoxyde diamine
HMX	octahydro-1,3,5,7-tétranitro-1,3,5,7-tétrazocine
HRP	peroxydase de raifort, <i>horseradish peroxidase</i>
IED	engin explosif improvisé, <i>improvised explosive device</i>
Ig	immunoglobuline

IgE	immunoglobuline de type E
IgG	immunoglobuline de type G
IRM	imagerie par résonance magnétique nucléaire
LDA	analyse par discrimination linéaire, <i>linear discrimination analysis</i>
MEC	matrice extra-cellulaire
NAPPA	<i>nucleic acid programmable protein array</i>
NBT	bleu de nitrotétrazolium, <i>nitroblue tetrazolium</i>
NG	nitroglycerine
NHS	N-hydroxysuccinimide
Ni-NTA	acide nitriloacétique – nickel, <i>nickel-nitriloacetic acid</i>
NSP	toxine neurologique, <i>neurologic shellfish poisoning</i>
NTA	acide nitriloacétique
OA	acide okadaïque
OMS	organisation mondiale de la santé
OVA	ovalbumine
PBS	tampon phosphate salin, <i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-TA	PBS-tween albumine
PCA	analyse en composantes principales, <i>principal component analysis</i>
PCB	polychlorobiphényle
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDMS	poly-(diméthylsiloxane)
PISA	<i>protein in situ array</i>
PLS	moindre carrés partiels, <i>partial least squares</i>
PSA	antigène spécifique de la prostate, <i>prostate specific antigen</i>
PSP	toxine paralytique, <i>paralytic shellfish poisoning</i>
RAST	<i>radio allergeo-sorbent assay</i>
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RDB	domaine de fixation de Ras, <i>Ras binding domain</i>
RDX	1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine
Ru(bpy)	tris(bipyridine)ruthénium
SAM	monocouches auto-assemblées, <i>self-assembled monolayer</i>
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SERS	<i>surface-enhanced Raman scattering</i>
SPR	résonance plasmonique de surface, <i>surface plasmon resonance</i>
TAA	antigène associé aux tumeurs, <i>tumor-associated antigen</i>
TATP	triacétone triperoxyde
TMB	2,2',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNBS	acide picrylsulfonique
TNT	2,4,6-trinitrotoluène
TPO	test de provocation orale
VBS	tampon véronal salin, <i>veronal-buffered saline</i>
VBS-TA	VBS-tween albumine
VEGF	facteur de croissance endothéliale vasculaire, <i>vascular endothelial growth factor</i>

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	6
ABRÉVIATIONS.....	9
SOMMAIRE.....	13
TABLE DES FIGURES.....	17
INTRODUCTION	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
CHAPITRE 1. LES BIOPUCES POUR LA DÉTECTION MULTIPARAMÉTRIQUE ET HAUT-DÉBIT	27
1. <i>Introduction</i>	29
1.1. Les biopuces, de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique	29
1.2. Principe général de réalisation d'une biopuce.....	33
2. <i>Supports</i>	34
2.1. Supports à deux dimensions	34
2.2. Supports à trois dimensions.....	37
3. <i>Techniques de fabrication</i>	41
3.1. Synthèse des sondes in situ	41
3.2. Dépôt de solution de sondes	45
4. <i>Stratégies d'immobilisation</i>	50
4.1. Adsorption	50
4.2. Inclusion.....	51
4.3. Capture par affinité.....	51
4.4. Immobilisation covalente.....	54
5. <i>Méthodes de détection</i>	60
5.1. Détection avec marquage	60
5.2. Détection sans marquage	70
6. <i>Analyse des résultats</i>	75
6.1. Pré-traitement des données	75
6.2. Méthodes d'analyse.....	76
CHAPITRE 2. MARQUEURS BIOLOGIQUES ET DIAGNOSTIC.....	81
1. <i>Etat pathologique et diagnostic</i>	83
1.1. Les allergies.....	83
1.2. Le cancer	86
2. <i>Etat de l'art de la détection de biomarqueurs</i>	92

2.1.	Immunotests	92
2.2.	Détection d'IgE et diagnostic des allergies.....	96
2.3.	Diagnostic du cancer	99
CHAPITRE 3. CONTRÔLE ENVIRONNEMENTAL		109
1.	<i>Détection de polluants pour le contrôle environnemental</i>	111
1.1.	Pesticides	112
1.2.	Phycotoxines	116
1.3.	Explosifs	118
2.	<i>Détection de précurseurs d'explosifs pour le contrôle anti-terroriste</i>	123
2.1.	Précurseurs utilisés pour la synthèse d'explosifs et la fabrication de bombes artisanales.....	123
2.2.	Systèmes de détection de précurseurs d'explosifs dans l'eau	124
3.	<i>Le projet européen BONAS</i>	125
PARTIE EXPERIMENTALE.....		127
CHAPITRE 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES		129
1.	<i>Matériels</i>	131
1.1.	Réactifs	131
1.2.	Supports	135
1.3.	Instruments.....	135
1.4.	Logiciels.....	135
2.	<i>Méthodes</i>	136
2.1.	Préparation des sondes	136
2.2.	Caractérisation des conjugués	137
2.3.	Préparation des puces par dépôt automatisé de faibles volumes	139
2.4.	Préparation des puces par sérigraphie	142
2.5.	Modification des puces sérigraphiées.....	144
2.6.	Caractérisation des polymères et des surfaces.....	146
2.7.	Immunoessais	147
2.8.	Génération et analyse des signaux	153
RESULTATS ET DISCUSSION		159
CHAPITRE 5. DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE DÉTECTION DESTINÉ AU DIAGNOSTIC MÉDICAL		161
1.	<i>Introduction</i>	163
1.1.	Une réponse à des besoins spécifiques pour le diagnostic	163
1.2.	Conception de l'outil d'analyse immunologique à haut débit	164
2.	<i>Application 1 : Le diagnostic des allergies</i>	166
2.1.	Etude préliminaire : Optimisation des paramètres	166

2.2.	Développement d'une puce à protéine pour le diagnostic des allergies	167
❖	Article 1.....	167
3.	<i>Application 2 : Le diagnostic du cancer</i>	185
3.1.	Etude préliminaire	186
3.2.	Développement d'une puce à protéine pour le diagnostic du cancer	190
❖	Article 2.....	190
CHAPITRE 6.	DÉVELOPPEMENT D'OUTILS DE DÉTECTION DESTINÉS AU CONTRÔLE ENVIRONNEMENTAL	203
1.	<i>Introduction</i>	205
2.	<i>Application 1 : Le contrôle de la qualité de l'eau</i>	206
2.1.	Conception de l'outil d'analyse multiparamétrique à haut débit	206
2.2.	Optimisation des paramètres principaux.....	208
2.3.	Développement d'une puce pour le contrôle environnemental.....	211
❖	Article 3.....	211
2.4.	Etude complémentaire : Comparaison avec un ELISA classique	225
❖	Article 4.....	225
3.	<i>Application 2 : Le contrôle de l'utilisation de précurseurs de synthèse d'explosifs</i>	235
3.1.	Etude préliminaire	235
3.2.	Développement d'un capteur électrochimique pour la détection de précurseurs d'explosifs.....	238
❖	Article 5.....	238
4.	<i>Etudes complémentaires : Immunocapteur à signal électrochimique</i>	247
4.1.	Principe	247
4.2.	Réalisation de l'immunoessai en tube	248
4.3.	Mesure électrochimique.....	249
4.4.	Perspectives	253
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	255
RÉFÉRENCES	261

Table des figures

<i>Figure 1-1. Principe général de fonctionnement d'un biocapteur.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 1-2. Principe général de fonctionnement d'une biopuce.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 1-3. Exemples d'architectures utilisées en immunotest multiparamétrique.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 1-4. Puce à ADN.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 1-5. Schéma de principe des nanobarcodes particules.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 1-6. Illustration des méthodes de synthèse de sondes protéiques in situ.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 1-7. Schéma de principe de la méthode DAPA.....</i>	<i>44</i>
<i>Figure 1-8. Electroadressage d'anticorps modifiés sur la surface d'une électrode sérigraphiée.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 1-9. Modes d'immobilisation utilisés dans la préparation de biopuces.....</i>	<i>50</i>
<i>Figure 1-10. Structure de la streptavidine, complexée avec quatre biotines.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 1-11. Immobilisation d'une protéine par son étiquette 6-his.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 1-12. Immobilisation covalente de peptides ou de petites molécules par formation d'un cycle thiazolidine.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 1-13. Immobilisation covalente de protéine grâce à une activité enzymatique.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 1-14. Diagramme de Jablonski simplifié.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 1-15. Spectres d'émission des fluorophores commerciaux Alexa Fluor®.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 1-16. Solutions fluorescentes basées sur des Quantum Dots de différentes tailles.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 1-17. Représentation schématisée d'un immunoessai avec une amplification du signal par RCA.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 1-18. Réactions de chimiluminescence utilisées en chimie analytique.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 1-19. Système de détection associé à l'électrochimiluminescence du luminol.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 1-20. Allure du signal colorimétrique obtenu par marquage enzymatique.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 1-21. Principe de la détection colorimétrique catalysée par la HRP associée à la production locale de son substrat.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure 1-22. Stratégie de marquage par des nanoparticules métalliques pour la détection électrochimique d'interactions antigène/anticorps.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 1-23. Schéma de principe de fonctionnement d'un système à microleviers en flux.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 1-24. Diagramme des méthodes chimiométriques utilisées pour l'analyse des données de biopuces.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 1-25. Spectres obtenus par SERS et leur représentation graphique après analyse en composantes principales.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 1-26. Diagramme de résultats obtenus par mesure de fluorescence et leur représentation graphique après analyse par discrimination linéaire.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 1-27. Image de résultats obtenus après détection colorimétrique et leur représentation graphique après analyse par cluster hiérarchique.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 2-1. Mécanisme de l'allergie.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 2-2. Principe des tests "CAP", commercialisés par Phadia.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 2-3. Structure générale d'une immunoglobuline.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 2-4. Immunoessai par marquage direct.....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 2-5. Immunoessai en mode sandwich.....</i>	<i>94</i>

Figure 2-6. Immunoessai en mode capture	95
Figure 2-7. Immunoessai en mode compétitif	95
Figure 2-8. Système de détection multiparamétrique de TAA par électrochimiluminescence	102
Figure 2-9. Image de la détection colorimétrique d'anticorps anti-TAA	104
Figure 3-1. Détection colorimétrique de polluants sur un support de format DVD	115
Figure 3-2. Principe d'immunoessai en flux latéral pour la détection de toxines	117
Figure 3-3. Schéma de principe de la détection multiparamétrique d'explosifs par mesure de fluorescence, analysées par PCA	121
Figure 4-1. Couplage des molécules sondes à des porteurs	136
Figure 4-2. Spectre de masse de la BSA et du conjugué BSA-2,4-D	138
Figure 4-3. Dépôt des sondes sur support membranaire ou adhésif pour utilisation en fond de plaque 96-puits	139
Figure 4-4. Matrice des sondes allergènes	140
Figure 4-5. Matrice des sondes d'antigènes associés aux tumeurs	141
Figure 4-6. Matrice des sondes de polluants	142
Figure 4-7. Principe de sérigraphie des électrodes	142
Figure 4-8. Préparation de la puce de polycarbonate pour la détection de précurseurs d'explosifs	143
Figure 4-9. Préparation de la puce sur papier pour la détection de polluants	144
Figure 4-10. Modification de la puce	144
Figure 4-11. Outil d'assemblage de la puce aux tuyaux d'évacuation	145
Figure 4-12. Préparation et assemblage de la puce sur papier	145
Figure 4-13. Profilomètre NJ-Optimal	146
Figure 4-14. Automate EVO75	148
Figure 4-15. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour le diagnostic d'allergies (1 étape)	149
Figure 4-16. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour le diagnostic du cancer (2 étapes)	150
Figure 4-17. Protocole de l'immunoessai en mode compétitif	151
Figure 4-18. Protocole de l'immunoessai en suspension	153
Figure 4-19. Génération du signal colorimétrique catalysée par la phosphatase alcaline	154
Figure 4-20. Analyse du signal colorimétrique avec GenePix Pro	154
Figure 4-21. Génération du signal de chimiluminescence du luminol, catalysée par la peroxydase du raifort	155
Figure 4-22. Génération du signal électrochimique, catalysée par la phosphatase alcaline	157
Figure 5-1. Images des membranes sur les deux faces de la plaque 96-puits	164
Figure 5-2. Image des membranes obtenues suite à l'optimisation de différents paramètres	166
Figure 5-3. Image des membranes obtenues lors des tests de reconnaissance des TAA immobilisés par des solutions d'anticorps commerciaux	186
Figure 5-4. Image des membranes obtenues suite à l'optimisation de différents paramètres	188
Figure 5-5. Image des membranes obtenues pour différentes dilutions du sérum P7	189
Figure 5-6. Exemple de courbe de l'intensité du signal colorimétrique en fonction de la dilution de l'échantillon de sérum	189
Figure 5-7. Représentation graphique de l'intensité moyenne des signaux obtenus pour chaque sonde lors d'un test de reproductibilité	190

<i>Figure 6-1. Représentation schématique des supports envisagés pour l'immobilisation de matrices de plots en fond de puits</i>	<i>208</i>
<i>Figure 6-2. Image de profilométrie et profil du réseau d'électrodes.....</i>	<i>236</i>
<i>Figure 6-3. Images des électrodes de travail observées en microscopie optique.....</i>	<i>237</i>
<i>Figure 6-4. Images des électrodes observées par microscopie électronique à balayage, couplée à une analyse élémentaire</i>	<i>238</i>
<i>Figure 6-5. Principe de fonctionnement de l'électrode sur papier pour la détection électrochimique de polluant catalysée par une enzyme après immunoessai en suspension</i>	<i>248</i>
<i>Figure 6-6. Image résultant de l'acquisition après immunoessai en déplacement</i>	<i>249</i>
<i>Figure 6-7. Courbes de voltammétrie cyclique en présence du substrat ou produit de la phosphatase alcaline</i>	<i>250</i>
<i>Figure 6-8. Courbes de chronoampérométrie en présence du substrat ou produit de la phosphatase alcaline</i>	<i>251</i>
<i>Figure 6-9. Courbes de chronoampérométrie pour différentes concentrations de substrat.....</i>	<i>252</i>
<i>Figure 6-10. Courbes de chronoampérométrie en présence de surnageant de déplacement à différentes concentrations de 2,4-D</i>	<i>253</i>
 <i>Tableau 1-1. Fonctions impliquées dans la création de liaisons covalentes et surfaces associées</i>	 <i>55</i>
<i>Tableau 2-1. Exemples de biomarqueurs décrits dans la littérature</i>	<i>89</i>
<i>Tableau 5-1. Correspondance des classes ImmunoCAP</i>	<i>167</i>
<i>Tableau 5-2. Comparaison des résultats obtenus sur puce à allergène et par test ImmunoCAP.....</i>	<i>168</i>
<i>Tableau 6-1. Liste des polluants sélectionnés.....</i>	<i>207</i>
<i>Tableau 6-2. Détermination du nombre de molécules greffées par molécule de BSA</i>	<i>209</i>
<i>Tableau 6-3. Substrat et produit de la réaction catalysée par la phosphatase alcaline puis par mesure électrochimique</i>	<i>249</i>

Introduction

Ces dernières décennies ont connu une importante avancée dans le domaine des biotechnologies, avec l'avènement des biopuces. Ces nouveaux outils d'analyse multiparamétriques ont permis d'envisager des concepts jusqu'alors irréalisables tels que le séquençage du génome humain, mais aussi des applications dans de nombreux domaines.

Le domaine de la santé est sans doute celui qui a le plus été marqué par le développement de ces systèmes. Ils ont permis d'une part une meilleure compréhension de certains mécanismes, avec par exemple les puces de haute densité permettant le criblage des interactions pour des banques de protéines, mais aussi dans la recherche de nouveaux médicaments, ou encore la mise au point de nouveaux tests de diagnostic. C'est dans cette dernière thématique que s'intègre le premier axe de cette thèse. Un outil d'analyse multiparamétrique a été développé pour la détection d'anticorps spécifiques d'allergènes d'une part, et de marqueurs de cancer d'autre part, pour le diagnostic de ces deux pathologies. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'allergie touche environ une personne sur trois dans les pays développés, elle représente le 4^{ème} problème de santé publique mondial. A l'heure actuelle, la première méthode utilisée pour leur diagnostic est le test cutané, puis le test de provocation orale. Cependant, les procédés associés à ces méthodes sont pénibles, et les résultats parfois imprécis. Ils tendent donc depuis quelques années à être remplacés par des systèmes de dosage des anticorps spécifiques anti-allergènes dans le sérum des patients, en format biopuce par exemple.

Avec environ 25 millions de personnes touchées dans le monde, le cancer est également une pathologie très répandue, qui est de plus associée à un fort taux de mortalité. En effet, parmi cette importante population de patients, environ 60 % perdent leur combat contre cette maladie, notamment à cause d'un diagnostic trop tardif. Les méthodes non-invasives utilisées de nos jours, utilisant l'imagerie médicale, sont efficaces pour le suivi des patients, mais sont rarement adaptées pour le diagnostic précoce. Le développement d'outils permettant le diagnostic précoce du cancer à partir d'un échantillon de sang représente donc un réel enjeu afin de diminuer le taux de mortalité de cette pathologie. Dans cette optique, un système d'analyse multiparamétrique a été développé, basé sur la détection d'auto-anticorps anti-antigènes associés aux tumeurs dans le sérum des patients.

Les nouveaux outils d'analyse peuvent également être appliqués à des fins de contrôle environnemental. La démonstration récente des problèmes liés à la pollution des eaux par des perturbateurs endocriniens, pour ne citer qu'un exemple, a généré une forte demande de la part de différentes institutions pour la mise au point de systèmes analytiques pour contrôler la qualité de l'eau. Dans ce contexte mêlé à l'association à un projet européen pour un objectif proche, et en s'appuyant sur l'expérience acquise grâce à la thématique précédente, différents outils ont été développés pour la détection de polluants. Des pesticides, des toxines et des explosifs ont dans un premier temps pu être détectés à l'aide d'un immunotest compétitif multiparamétrique. Et, dans un second temps, l'application s'est concentrée sur la détection de précurseurs de synthèse d'explosifs, pour la localisation d'activités terroristes de préparation de bombes artisanales par exemple. Pour cela, un système de détection multiparamétrique

par mesure électrochimique sur site a été développé. Ces problématiques conduisent le second axe de cette thèse.

Ce manuscrit se divise en trois parties. La première rappelle le contexte de l'étude, la seconde correspond à la partie expérimentale, et la dernière s'intéresse aux résultats obtenus au cours de la thèse. Le premier chapitre se focalise sur les systèmes de biopuces, décrivant notamment les différentes étapes mises en œuvre dans la fabrication et l'utilisation de ces outils. Elle ne prétend pas être exhaustive, le but étant ici de présenter un ensemble de méthodes qui auraient pu être utilisées pour le développement des outils d'analyse multiparamétrique faisant l'objet de la thèse. Le second chapitre présente des notions concernant les mécanismes de l'allergie et du cancer, ainsi que des méthodes de diagnostic en insistant sur celles en format biopuce. Le troisième s'intéresse à la détection de polluants et de précurseurs de synthèse d'explosifs, en s'appuyant également sur les systèmes décrits dans la bibliographie correspondante. Le chapitre quatre est consacré à la partie expérimentale. Enfin, les chapitres cinq et six traitent des résultats obtenus, en s'articulant autour des articles publiés au cours de la thèse, et des manuscrits soumis ou en préparation.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Les biopuces pour la détection multiparamétrique et haut-débit

1. INTRODUCTION

1.1. LES BIOPUCES, DE NOUVEAUX OUTILS D'ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE

Historiquement, les analyses effectuées pour toutes sortes d'applications consistent en la détection d'un analyte suite à un prélèvement. Quand la mesure de multiples analytes est requise, l'échantillon est conventionnellement divisé en plusieurs aliquots, pour une analyse de chacun indépendamment. Un exemple caractéristique de cette approche concerne les analyses cliniques réalisées dans les laboratoires hospitaliers actuels, pour lesquelles le diagnostic ou le suivi de certains paramètres est effectué en divisant les prélèvements pour mesurer séparément le taux de différents analytes tels que le glucose, le cholestérol, la créatinine, l'acide urique, la lactate déshydrogénase, les ions sodium, le potassium et d'autres composés cliniquement pertinents.

Ces dernières décennies ont vu le développement de nouveaux outils d'analyse : les biocapteurs. Le premier biocapteur a été développé en 1962 par Clark et Lyons, permettant pour la première fois la mesure électrochimique de la concentration en glucose dans le sang. Ces outils analytiques sont caractérisés par l'association d'un récepteur, responsable de la reconnaissance moléculaire d'un analyte, à un transducteur qui transforme le signal biochimique en un signal physique mesurable (Figure 1-1).

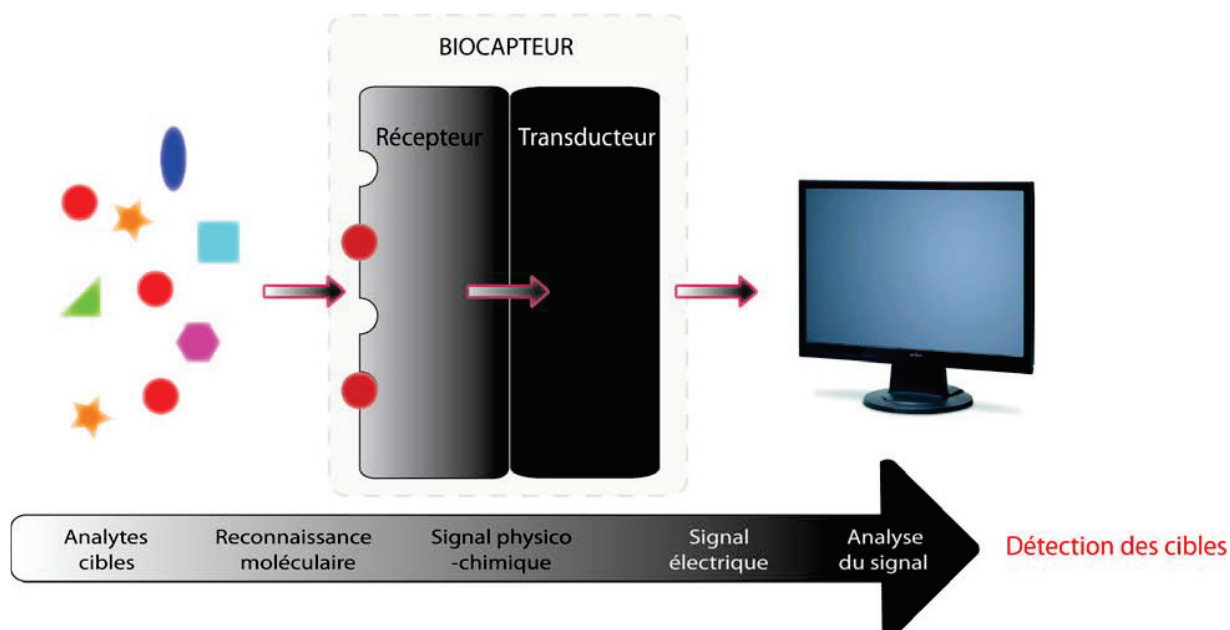


Figure 1-1. Principe général de fonctionnement d'un biocapteur

Initialement utilisés pour la détection d'un analyte unique, ou en regroupement de capteurs pour des analyses multiparamétriques, ces capteurs ont ensuite profité des progrès scientifiques en matière de miniaturisation. En effet, la possibilité d'augmenter la fonctionnalité d'un outil tout en réduisant sa taille (comme dans l'industrie micro-informatique) a conduit la communauté scientifique à envisager le

développement de nouveaux capteurs, multiparamétriques. En développant des méthodes permettant d'immobiliser différents composés à différentes positions sur un substrat donné, il est devenu possible de produire des capteurs présentant des matrices de sondes, ou récepteurs, de moyenne ou basse densité. Ces outils multi-fonctionnels permettent ainsi la mesure simultanée de plusieurs analytes, en amenant simplement les échantillons au contact de ces matrices. C'est le début des analyses multiparamétriques sur biopuces.

Une biopuce est un système miniaturisé qui consiste en un support solide (lame de verre, surfaces métalliques, microbilles, supports membranaires etc.) sur lequel sont immobilisées des molécules sondes : brins d'ADN, protéines ou petites molécules. Ces sondes, disposées sur le support en matrice selon des positions définies, représentent la partie « récepteur » du capteur et sont les éléments responsables de la reconnaissance moléculaire des multiples analytes associés. Cette matrice de sonde est mise en présence de molécules cibles présentes dans un échantillon afin de permettre la reconnaissance spécifique des cibles. Leur interaction génère alors, de manière directe ou non, un signal mesurable, clé de la détection. C'est la partie « transducteur » de ce capteur multiparamétrique. L'analyse du signal permet ensuite d'identifier les positions révélant une interaction sonde/cible, et donc de déterminer les molécules présentes dans l'échantillon, de façon qualitative ou quantitative. Ce principe général est illustré sur la Figure 1-2.

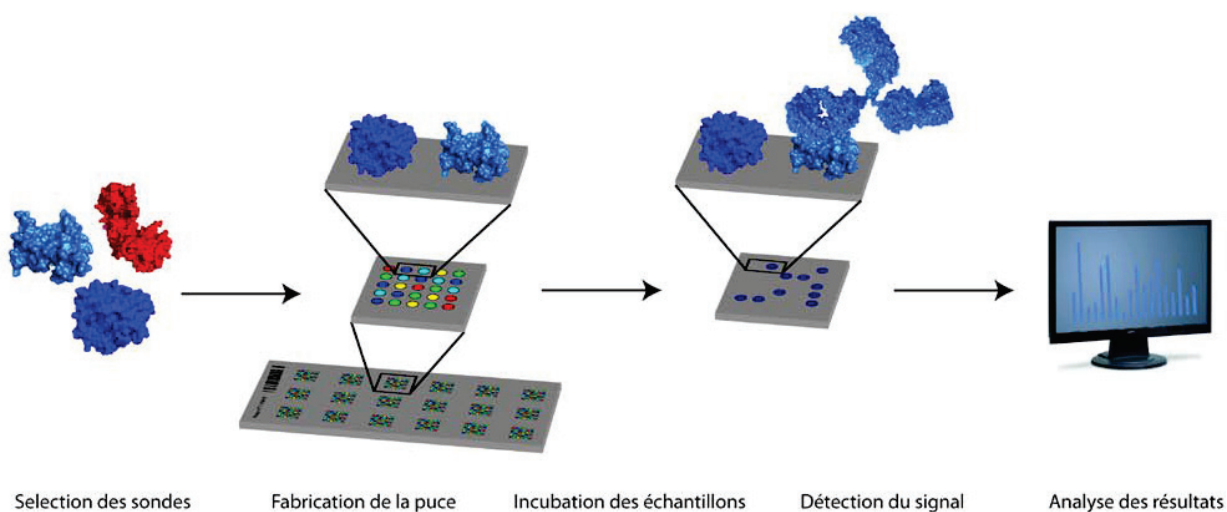


Figure 1-2. Principe général de fonctionnement d'une biopuce

Le développement des biopuces a commencé par celui des puces à ADN, qui ont permis par exemple le projet de séquençage du génome humain par un consortium international (Lander *et al.* 2001). Ces puces rendent possible l'analyse de milliers de séquences ADN en parallèle, en seulement quelques heures. Elles permettent d'identifier et de repérer des mutations, de savoir quels gènes sont transcrits en réponse à l'action d'une molécule, ou sont impliqués dans une maladie. Le segment des puces à ADN est aujourd'hui majoritaire sur le marché mondial des puces, représentant 1,3 milliards de dollars en 2009, il devrait atteindre 2,7 milliards en 2014, avec une croissance annuelle de 15,2%. Cependant, pour

permettre l'étude de systèmes biologiques complexes, de nouveaux outils et notamment des biopuces permettant le suivi de l'expression des gènes sont nécessaires. En effet, ce sont les protéines qui reflètent le fonctionnement réel d'une cellule. Il s'agit alors d'élaborer des puces offrant la possibilité de mesurer de façon massivement parallèle les taux d'expression des protéines d'une cellule, leurs modifications post-traductionnelles, leurs différentes interactions, ou encore certaines activités catalytiques.

L'utilisation des puces à protéines implique des contraintes supplémentaires : les protéines ont *in vivo* une structure tridimensionnelle qui les caractérise, et qui doit, lors des tests, être préservée. Elles peuvent également avoir une activité catalytique ou des sites spécifiques de reconnaissance qui doivent eux aussi être conservés afin d'obtenir des résultats d'analyse fiables et interprétables. Constituées d'un enchaînement d'acides aminés (chargés positivement, négativement ou non chargés au pH physiologique, hydrophiles ou hydrophobes etc.), les protéines sont caractérisées par des régions de fonctions différentes, qui influencent les interactions mises en place. La préparation d'une puce à protéines pour une étude d'interactions *in vitro* implique donc de prêter une grande attention aux paramètres qui pourraient modifier les différentes caractéristiques propres à la protéine. Malgré ces contraintes, la recherche sur les puces à protéines est très active depuis de nombreuses années.

Les puces à protéines peuvent être séparées en deux catégories, les puces analytiques et les puces fonctionnelles. La compréhension des interactions moléculaires qui définissent un protéome est l'un des buts principaux de la protéomique fonctionnelle, et les puces fonctionnelles sont un outil extrêmement puissant pour l'accomplissement de cette tâche. Schreiber et son équipe ont par exemple décrit en 2000 une puce à protéines recombinantes immobilisées sur lame de verre, avec conservation de leur intégrité moléculaire et fonctionnelle, et permettant l'étude d'interaction protéine/protéine mais aussi avec de petites molécules (MacBeath and Schreiber 2000). Plus récemment, Synder et son équipe ont démontré la possibilité d'immobiliser un grand nombre de protéines (environ 5800 protéines de *Saccharomyces Cerevisiae*) pour l'étude d'interaction protéine/lipides, puis pour l'identification des substrats d'un grand nombre d'enzymes différentes (87 protéines kinases) (Zhu *et al.* 2001, Ptacek *et al.* 2005). L'autre type d'utilisation des puces à protéine concerne l'analyse multiparamétrique. Ces puces analytiques permettent d'obtenir des informations quantitatives ou semi-quantitatives sur la présence de molécules cibles dans un échantillon. Ces puces ont des applications dans de très nombreux domaines tels que le diagnostic, le contrôle de la présence de contaminants dans l'eau ou l'alimentation pour la sécurité ou l'environnement, mais aussi pour le criblage (biomarqueurs ou médicaments par exemple). Ces différentes applications font des puces à protéines un autre marché important, représentant 350 millions de dollars en 2009, et se rapprochant du milliard de dollars en 2014.

Parmi les différents types de biopuces, les immunotests miniaturisés ont fait très tôt l'objet d'une grande attention. En effet, la première analyse multiparamétrique par immunotest a été décrite par Ekins et Chu en 1991. Leur analyse était basée sur l'utilisation de microplots d'anticorps, mis en présence d'une solution contenant des analytes, avec une détection par fluorescence (Ekins and Chu 1991). Ces tests ont été développés entre autres pour des applications de diagnostic, ainsi que pour le contrôle environnemental, par l'analyse multiparamétrique de biomarqueurs ou de polluants. Plusieurs types d'architectures ont été couramment utilisés, basés sur la reconnaissance antigène-anticorps. Différents

exemples sont illustrés sur la Figure 1-3, pour des systèmes de détection avec marquage. Ces immunotests multiparamétriques ont été l'objet de la majeure partie de cette thèse et seront donc particulièrement décrits.

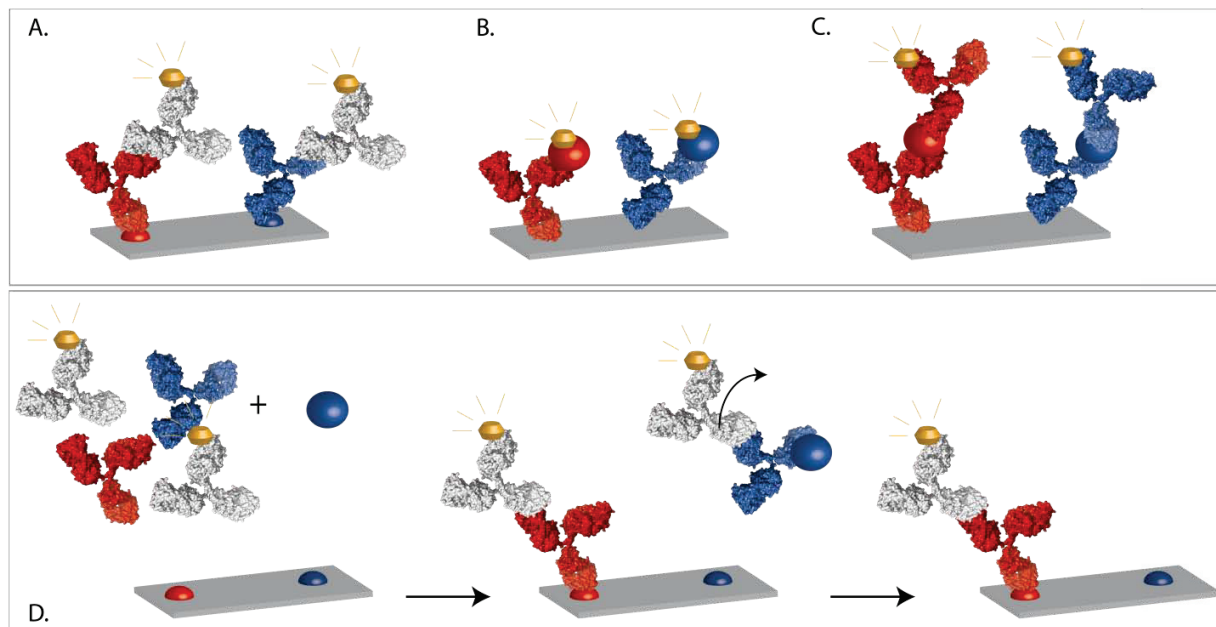


Figure 1-3. Exemples d'architectures utilisées en immunotest multiparamétrique

A. mode capture, B. marquage direct, C. sandwich, D. compétitif

La technologie des biopuces a également été utilisée avec d'autres types de sondes. En effet, des puces composées de petites molécules ont par exemple été développées. En 1999, Schreiber et son équipe ont décrit la première puce à petites molécules pour l'analyse d'interactions avec les protéines (MacBeath *et al.* 1999). Ce type d'outil requiert lui aussi des méthodes d'immobilisation qui lui sont propres, adaptées à la taille des sondes. En 2002, la même équipe développe une puce à petites molécules constituées de 3780 sondes grâce à une nouvelle approche combinatoire (Kuruvilla *et al.* 2002).

Dans un désir d'amélioration des techniques d'analyse existantes, pour le diagnostic ou le contrôle environnemental par exemple, mais également dans une volonté de compréhension des propriétés et des mécanismes impliqués dans différents processus *in vivo*, il a été nécessaire de développer des technologies permettant à la fois un multiplexage (essais multiparamétriques), une miniaturisation, une automatisation et une parallélisation, en vue d'une analyse à haut-débit. Avec l'avènement des biopuces, le scientifique habituellement confronté à l'analyse de quelques dizaines de points expérimentaux, aura sans doute bientôt à travailler avec des centaines de milliers de données. Cette révolution technologique nécessite donc aussi une évolution des études *in silico*, pour le stockage et l'analyse des données générées.

1.2. PRINCIPE GENERAL DE REALISATION D'UNE BIOPUCE

La réalisation d'une biopuce comprend deux aspects : la fabrication et la mise en œuvre. Les différentes techniques mises en jeu doivent être définies et optimisées en fonction de l'application souhaitée. Chaque étape a ses propres enjeux et est critique pour l'obtention d'une biopuce performante. Lors de la fabrication, le premier point clé est la production des sondes à immobiliser sur le support. Cette étape est dépendante du type de sonde utilisée puisque le processus mis en œuvre sera différent selon qu'il s'agisse de protéines, de sondes ADN ou encore de petites molécules, qu'elles soient produites au préalable ou directement sur la puce. La seconde étape consiste en l'immobilisation de ces sondes sur le support. Le choix du support est à la fois déterminant pour l'étape d'immobilisation, et déterminé par les choix technologiques faits notamment par rapport au mode de détection des interactions. Ceci explique pourquoi de nombreux supports ont été et sont encore développés, afin d'améliorer la qualité des biopuces. A chaque support pourront correspondre plusieurs méthodes d'immobilisation mais également différents modes de dépôt.

Lors de l'utilisation, la première étape consiste en l'incubation de la matrice de sondes avec les molécules cibles. Un échantillon (prélèvement biologique ou environnemental par exemple) est alors mis en contact avec la biopuce afin de générer les interactions moléculaires recherchées (interaction des antigènes immobilisés sur le support avec leurs anticorps spécifiques). Il est alors nécessaire de contrôler la spécificité et la sensibilité des interactions, de façon à obtenir des signaux significatifs et spécifiques. Enfin, le dernier point clé consiste en la détection du signal généré par la reconnaissance sonde/cible, et en son analyse.

2. SUPPORTS

Le choix du support est une étape clé de la préparation des puces. Il doit être conditionné par l'application de la puce et par les exigences du contexte de l'utilisation. Ce choix sera donc intimement lié à la méthode de détection désirée. Certains supports seront privilégiés pour une détection optique, d'autres pour une détection électrochimique etc. En effet, à titre d'exemple, certains supports présentant une fluorescence intrinsèque (auto-fluorescence) ne pourront être utilisés pour une détection par fluorescence du fait d'un bruit de fond trop important. De plus, le support choisi devra être adapté à la stratégie d'immobilisation et de fabrication. Les supports rigides seront les mieux adaptés à l'automatisation, et à la production de biopuces en vue d'une commercialisation. Ces étapes de préparation et d'utilisation se conditionnent les unes les autres avec chacune ses exigences, ses avantages et ses inconvénients en termes de facilité de préparation et d'utilisation, de précision, d'efficacité, de solidité ou de reproductibilité.

Les supports permettant de fixer les sondes peuvent être classés selon deux groupes. Les supports en deux dimensions d'une part, (le plus souvent support en verre activé par différentes chimies de surface) permettent une bonne reproductibilité, une bonne sensibilité et de faibles signaux non-spécifiques, pour lesquels cependant, la structure tridimensionnelle des protéines est difficilement conservée. Les supports en trois dimensions (gel d'agarose ou de polyacrylamide, membrane de nitrocellulose) quant à eux permettent l'immobilisation grâce à une matrice poreuse dans laquelle les protéines sont piégées, dans un environnement hydraté qui aide à la conservation de leur conformation fonctionnelle et qui permet une bonne accessibilité à leurs sites actifs. Les supports en deux dimensions sont rarement utilisés sans fonctionnalisation, dont dépendra la stratégie d'immobilisation, tandis qu'à l'inverse, les supports en trois dimensions sont généralement utilisés tels quels, pour de l'adsorption pure. Quelques supports, les plus couramment utilisés, vont être développés ici (Kingsmore 2006, Jonkheijm *et al.* 2008).

2.1. SUPPORTS A DEUX DIMENSIONS

2.1.1. MATERIAUX INORGANIQUES

2.1.1.1. VERRE

Le verre est le support le plus utilisé, classiquement sous la forme de lame de microscopie. Ce support est rigide, transparent, et facilement disponible. Il est de plus solide, donc plus facilement utilisable pour l'automatisation, le haut-débit et la commercialisation. Il permet de procéder à de nombreuses modifications chimiques de surface, utiles pour l'immobilisation des sondes. Les différents pré-traitements envisageables pour les rendre fonctionnels, également applicables à d'autres types de supports, seront décrits dans la partie immobilisation. En 1999 déjà, MacBeath et son équipe décrivaient l'utilisation de ce support, et sa fonctionnalisation pour immobiliser des billes liées à de petites molécules à raison de plus de 1000 plots par cm^2 , pour une immunodétection par fluorescence

(MacBeath *et al.* 1999). La méthode de fonctionnalisation la plus utilisée est le traitement du support par des silanes-aldéhydes. Les aldéhydes exposés à la surface réagissent avec les groupements amines primaires des protéines en formant des bases de Schiff, ce qui entraîne l'immobilisation des protéines sondes.

La lame de verre peut aussi être recouverte d'un gel (polyacrylamide, agarose...) qui permettra une fixation par adsorption dans la structure poreuse 3D (Afanassiev *et al.* 2000). Avec ce type de support, la protéine est maintenue dans un environnement aqueux proche de l'environnement naturel, ce qui permet de garder une conformation native. L'inconvénient de ce support réside dans le risque de voir apparaître des signaux non-spécifiques importants.

2.1.1.2. QUARTZ

Le quartz a également démontré d'intéressantes propriétés, et a notamment servi de support pour la commercialisation de puces à ADN par Affymetrix (Figure 1-4). Ce matériau permet dans ce cas l'utilisation de la photolithographie pour la génération de sondes nucléotidiques directement à la surface de la puce. Il est également utilisé pour ses propriétés optiques, notamment sa faible auto-fluorescence. Son utilisation sous la forme de cristaux photoniques a récemment permis la détection multiparamétrique de marqueurs de cancer à des concentrations de l'ordre du pg/mL (Huang *et al.* 2012).

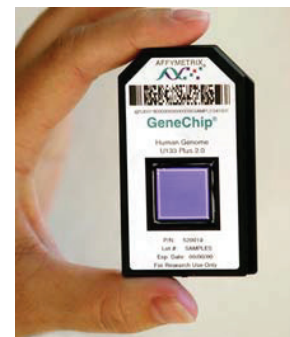


Figure 1-4. Puce à ADN
(Affymetrix)

2.1.1.3. SILICIUM

Le silicium est un autre support très utilisé, en particulier dans l'industrie des semi-conducteurs pour ses propriétés de conductivité électrique, de haute résistance aux solvants, de bonne stabilité mécanique et de basse fluorescence intrinsèque. Cretich et son équipe ont par exemple utilisé ce support recouvert par du dioxyde de silicium et fonctionnalisé par un polymère, afin d'amplifier le signal de fluorescence émis sur leur puce pour la détection d'allergènes. Cependant, le silicium a tendance à s'oxyder spontanément dans l'air, un pré-traitement peut alors permettre d'enlever la couche oxydée avant l'activation pour d'autres réactions. L'oxydation peut néanmoins être recherchée, ou générée grâce à l'utilisation de plasma. La surface de silicium peut alors être directement fonctionnalisée comme une surface de verre (Marquette *et al.* 2002, Cretich *et al.* 2010).

2.1.1.4. OR ET AUTRES SURFACES METALLIQUES

Les surfaces d'or sont aussi largement utilisées, du fait de leurs applications notamment pour la détection par la méthode de résonance des plasmons de surface ou par électrochimie. Elles offrent l'avantage d'être aisément fonctionnalisables par des couches auto-assemblées (SAM) de composés thiolés. Ces modifications ont été largement décrites et utilisées, entre autres pour les biopuces (Ulman 1996). L'inconvénient majeur de l'utilisation des SAM réside en leur mobilité sur le support solide, qui

limite la durée de vie de la puce, et leur sensibilité à la photo-oxydation. Cependant, cette propriété peut être utilisée pour modeler la surface à l'aide de techniques de lithographie (Brockman *et al.* 1999).

Le platine et l'argent sont deux autres types de surfaces fonctionnalisables avec des couches auto-assemblées. De plus, ces différents métaux, peuvent être utilisés sur des lames de verre par dépôt en fine couche (500 à 2000 Å pour les lames commercialisées par Arrayit).

Des surfaces métalliques peuvent également être générées par électrodépôt. Cette méthode, aussi appelée galvanoplastie est utilisée dans de nombreux domaines pour recouvrir des surfaces de dépôts métalliques. Pour des applications analytiques, cette approche a été utilisée par exemple pour la détection d'acide ascorbique et d'acide urique avec des électrode modifiées par dépôt de palladium (Matos *et al.* 2000), de peroxyde d'hydrogène et de glucose à l'aide d'une électrode de carbone vitreux modifiée par électrodépôt de nanoparticules d'argent (Wu *et al.* 2006), ou encore de marqueurs de cancer par chimiluminescence sur des électrodes modifiées par électrodépôt d'or (Corgier *et al.* 2007).

2.1.1.5. CARBONE

Les supports de carbone sont particulièrement utilisés pour des puces à détection électrochimique. Ces supports peuvent être oxydés électrochimiquement afin de former des groupements acides carboxyliques réactifs en surface, utilisés ensuite pour des réactions de couplage. De plus, le carbone peut être utilisé pour la fabrication de surfaces conductrices sur des supports isolants, tel que le plastique ou le papier. Des réseaux d'électrodes sont ainsi aisément fabriqués par sérigraphie et modifiés afin de générer des puces, comme il a été décrit pour la détection de différents type de molécules cibles (Yu *et al.* 2004, Corgier *et al.* 2005b, Kit-Anan *et al.* 2012).

2.1.2. PLASTIQUES ET POLYMERES

Les supports polymériques représentent une alternative intéressante aux surfaces inorganiques précédemment décrites. Leur production étant très peu onéreuse, ce sont des supports de choix pour la commercialisation. Les plaques utilisées pour les tests ELISA classiques par exemple sont généralement en polystyrène. Le polystyrène est également employé pour la détection multiparamétrique en biopuce, par l'immobilisation d'oligonucléotides et de protéines (Nahar *et al.* 2001, Perrin *et al.* 2003). Des études sur un mélange de polystyrène et de poly(méthyl méthacrylate) (PMMA) ont aussi démontré les qualités de ce mélange pour l'adsorption de protéines (Kumar *et al.* 2008).

Le PMMA a également fait l'objet de nombreuses études, traitant notamment de différentes modifications qui peuvent être apportées. Sa nano-texturation à l'aide de plasma par exemple a démontré une amélioration de l'immobilisation de protéines et de la sensibilité de la détection (Tsougeni *et al.* 2010). Un autre exemple concerne la fonctionnalisation de cette surface pour l'obtention de groupements aminés, permettant l'immobilisation de protéines (Soper *et al.* 2002). Cette étude traite également de la modification du polycarbonate, par sulfonation de la surface.

Des supports de polycarbonate ont été récemment utilisés sous la forme de CD-ROM de 1,2 mm d'épaisseur, modifiés par une couche d'aluminium ou, plus rarement, d'or. La surface est ensuite fonctionnalisée afin de permettre l'immobilisation covalente de protéines (Ivanov *et al.* 2013).

Le chlorure de polyvinyle (PVC) est un autre exemple de polymère ayant permis l'amélioration des qualités de détection d'une puce. Récemment, un capteur potentiométrique a été développé dans l'équipe de Wang, consacré à la détection de métaux lourds. Ces capteurs, composés de couches sensibles de silicium modifiées par des membranes de PVC ont démontré une amélioration de la reproductibilité, et une sélectivité acceptable pour cette application (Ha *et al.* 2012).

Enfin, le polydiméthylsiloxane (PDMS) est un élastomère couramment utilisé pour des applications biomédicales. Ses propriétés physico-chimiques font de ce support un outil de choix pour son utilisation dans les biopuces (Marquette and Blum 2004b). Il est chimiquement inerte, perméable aux gaz et à quelques solvants, transparent, non toxique et facile à manipuler dans les conditions standards d'un laboratoire. Cependant, ses applications restent limitées à cause de son comportement hydrophobe, de son caractère chimiquement inerte et d'une forte absorption non-spécifique parasite. Ces problèmes peuvent être en partie résolus en activant la surface par traitement à l'ozone afin de créer des groupements silanols, ou en utilisant les propriétés du PDMS pour immobiliser des biomolécules par leur domaine hydrophobe. Il est aussi utilisé dans la technique de « microcontact printing », en l'employant comme un tampon encreur avec les solutions protéiques à appliquer sur un support (Sia and Whitesides 2003, Heyries *et al.* 2007).

2.2. SUPPORTS A TROIS DIMENSIONS

Au lieu d'immobiliser les sondes sur des surfaces à deux dimensions, les molécules peuvent également être piégées dans des matrices poreuses, formant des surfaces spécifiques plus élevées. Ces matrices ont démontré de bonnes possibilités d'immobilisation, et permettent de créer un environnement hydraté, prévenant en partie la dénaturation des protéines.

2.2.1. PAPIER ET MEMBRANES

Ces supports poreux permettent une fixation par adsorption et/ou par covalence selon l'activation de la membrane, et une importante capacité d'immobilisation. Les membranes peuvent aussi être utilisées collées sur une lame de verre, telles que les lames *Fast slides*, fonctionnalisées par des membranes de nitrocellulose. Ceci permet l'augmentation de leur stabilité et de la résolution des plots (Joos *et al.* 2000). Les surfaces membranaires peuvent également être en nylon, caractérisées par une solidité plus importante, ainsi que par une bonne capacité d'immobilisation. Le nylon permet l'immobilisation des protéines par des interactions électrostatiques, alors que les interactions mises en jeu dans le cas de la nitrocellulose seraient plutôt hydrophobes (Campo and Bruce 2005).

Une étude récente a présenté les résultats de la comparaison entre différentes membranes de nitrocellulose commerciales apposées sur des lames de verre. Les propriétés des membranes composant les lames *Unisart* (Sartorius, Allemagne), *FAST* (GE Whatman, Allemagne) et *ONCYTE AVID* (Grace-

Biolabs, USA) ont été comparées. La morphologie des plots déposés, l'homogénéité de la distribution des biomolécules, et l'intensité des signaux associés ont été étudiés pour les différentes membranes, et les résultats ont été associés aux propriétés des supports, notamment leur hydrophobicité et la dynamique des flux de liquide (Mujawar *et al.* 2013).

Des membranes de polyfluorure de vinylidène, les membranes *Durapore* (Merck Millipore), ont également séduit par leurs propriétés de résistance mécanique, chimique et leur stabilité thermique. En effet, ces membranes ont non seulement démontré leur résistance aux conditions utilisées pour le clivage de peptides dans de l'acide trifluoroacétique, mais ont également servi de réservoir pour ce milieu. Dans l'étude rapportant leurs travaux, le groupe de Bischoff utilise également la flexibilité de ce matériau pour transférer des peptides, ainsi clivés, sur ces membranes recouvertes d'un film d'or (Schirwitz *et al.* 2013). Ce procédé a permis la fabrication après synthèse de puces de 10 000 plots par cm² de peptides purifiés, grâce au transfert de l'intégralité de la matrice depuis le support de synthèse directement sur la membrane.

La porosité des membranes a également généré un intérêt majeur dans la conception de tests fonctionnant par capillarité (Posthuma-Trumpie *et al.* 2009). C'est un support de choix pour le développement de tests jetables, simples d'utilisation et peu coûteux, particulièrement adaptés aux applications de diagnostic à réaliser directement par le patient, mais aussi pour l'analyse de l'eau pour différentes drogues ou molécules dangereuses. L'exemple le plus connu de ce type de test en bandelette est le test de grossesse. Cet immunotest est basé sur la détection du niveau de gonadotrophine chorionique humaine dans l'urine, et fonctionne par capillarité. L'échantillon test et les réactifs migrent sur la membrane jusqu'à une ligne de contact avec les biomolécules immobilisées, permettant une lecture visuelle du signal obtenu. L'utilisation des membranes est aussi un avantage pour les systèmes basés sur la filtration au travers du support. En effet, en permettant une augmentation du contact entre les sondes immobilisées et les cibles par filtration des échantillons, la sensibilité d'un système peut être améliorée.

Le papier est un support utilisé depuis peu, notamment pour des applications de diagnostic ou de contrôle environnemental. Whitesides et ses collègues ont les premiers fait la démonstration d'un nouveau type de *lab-on-a-paper* (par analogie aux *lab-on-a-chip*, les « laboratoires sur puce »), un outil analytique basé sur un support papier, qui combine la simplicité, la portabilité, le faible coût et le caractère jetable des tests bandelette, et l'analyse multiparamétrique des biopuces microfluidiques (Martinez *et al.* 2007, Martinez *et al.* 2010). Leur test, utilisant une révélation colorimétrique fait la preuve de concept d'une détection multiparamétrique (de protéines et de glucose) sur support papier. Plus récemment, le groupe de Wang a développé un autre outil diagnostique basé sur un support papier et un immunotest de type sandwich, pour une détection électrochimique de marqueurs de cancer, démontrant des performances analytiques comparables aux méthodes de références (Wang *et al.* 2012d). Ces supports sont donc des supports privilégiés pour le développement de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique.

2.2.2. HYDROGELS

Les hydrogels représentent des matrices hydrophiles dans lesquelles, selon la taille des mailles du gel, les protéines ou les petites molécules peuvent diffuser, permettant une capacité d'immobilisation de l'ordre de 100 fois supérieure par rapport aux surfaces planes (Guschin *et al.* 1997). La fabrication de biopuces stables peut être réalisée par la fixation de ces gels sur des supports solides. Par exemple, l'agarose ou le polyacrylamide peuvent être photopolymérisés sur des surfaces fonctionnalisées par des groupements acryl. Les polysaccharides tels que le chitosan ou le dextran servent également de support d'immobilisation. Le chitosan est un polysaccharide naturel, non toxique et biodégradable. Il peut être fixé à un support de verre, et permettre l'immobilisation de sondes par interactions électrostatiques. Le dextran est un polysaccharide complexe composé de molécules de glucose liées en chaînes de longueurs variables. Les groupements hydroxyles de ce polymère peuvent être oxydés pour générer des fonctions aldéhydes et ainsi être greffés à des supports amine-fonctionnalisés (Jonkheijm *et al.* 2008). C'est cette surface qui est utilisée pour les puces commercialisées par la société Biacore. Les aldéhydes n'ayant pas réagi peuvent ensuite être utilisés pour l'immobilisation de protéines.

Les hydrogels peuvent également être polymérisés directement sur un support avec les molécules sondes piégées à l'intérieur plutôt que de servir de support à l'immobilisation. Lim *et al.* ont par exemple démontré la formation d'un hydrogel de polyacrylamide contenant des brins d'ADN, grâce à la polymérisation de groupements acrylamides en position 5' des brins d'ADN (Lim *et al.* 2007). Neumann et ses collègues ont également proposé d'immobiliser des protéines et des oligonucléotides dans des plots à base de poly-(diméthylacrylamide) sur support plastique (Neumann *et al.* 2010). Très récemment, Le Goff *et al.* ont décrit la formation de plots d'hydrogels fonctionnalisés par des sondes oligonucléotidiques sur un support de *PolyShrink*, dédié à la détection colorimétrique et chimiluminescente de différentes cibles (Le Goff *et al.* 2013).

2.2.3. MICROSPHERES

L'immobilisation de biomolécules greffées sur des microsphères présente l'avantage, par rapport aux supports plans, de générer des surfaces spécifiques élevées. Il a été démontré que ces surfaces permettent d'augmenter la sensibilité des puces. La technologie de puces en suspension par exemple, utilise des microsphères optiquement codées, analysées par cytométrie en flux. Ces microsphères portant des récepteurs spécifiques, ont des propriétés optiques distinctes qui permettent leur identification, et ainsi leur utilisation pour des analyses multiplexes (Nolan and Sklar 2002). C'est sur ce principe que sont basées les technologies de type *x-MAP* de Luminex.

Ce type de supports a récemment été évalué par le groupe de Kang (Wang *et al.* 2012b). Leur étude, portant sur la détection de marqueurs tumoraux auprès de 1114 patients, a démontré que les analyses à l'aide de microsphères permettaient d'atteindre la même sensibilité, spécificité et précision dans les résultats que les méthodes conventionnelles, avec un temps d'analyse et un volume d'échantillon largement réduit.

Des microsphères magnétiques ont également prouvé leur utilité, lors d'analyses de composés de la famille des polychlorobiphényles (PCB), des polluants toxiques, par Centi et ses collègues. Deux immunotests à détection électrochimique ont été comparés. Dans les deux cas, des électrodes sérigraphiées sont utilisées comme transducteur, et l'immunoessai a lieu par compétition entre les PCB cibles en solution et les PCB couplés à une enzyme, immobilisés sur le support. Les sondes ont été immobilisées soit directement sur la surface de l'électrode, servant dans cette configuration de support à l'immunoessai et à la transduction du signal, soit sur des billes magnétiques, permettant alors la réalisation de l'immunoessai en suspension, avant d'être attirées par aimantation à la surface de l'électrode pour la transduction du signal. Leurs résultats expérimentaux ont démontré une importante amélioration de la sensibilité et de la rapidité de l'analyse dans le cas de l'utilisation des microsphères (Centi *et al.* 2007).

Un autre exemple de biopuce basé sur l'utilisation de microsphères magnétiques a été décrit par Yu et ses collègues en 2013 (Yu *et al.* 2013a). Cette fois, les microsphères ont permis la fabrication d'une matrice de sondes, auto-formée par contrôle magnétique, pour la détection de marqueurs de cancer sur une puce microfluidique. Leur étude décrit la génération de gradient de champ magnétique sur un support de nickel, permettant la formation de matrice de billes magnétiques de façon contrôlée, démontrant une bonne stabilité durant les étapes de lavage même avec un flux de 50 mL/min. Cette approche leur a permis d'obtenir une très bonne sensibilité et spécificité grâce à l'élimination par le flux continu de lavage de tous les contaminants adsorbés de façon non-spécifique.

2.2.4. NANOTUBES

D'autres supports d'analyse en suspension avec un codage intégré ont été décrits ces dernières années. Des nanoparticules appelées *nanobarcode*, par analogies aux codes barres utilisés dans le commerce ont été développés. Ces particules sont des nanotubes d'environ 9 μm de long pour quelques dizaines de nanomètres de diamètre, formés de zones d'or et d'argent

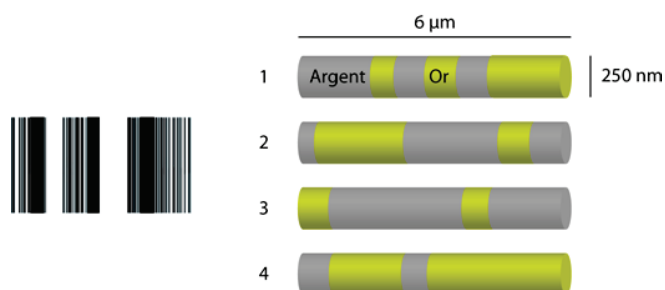


Figure 1-5. Schéma de principe des *nanobarcode particles*

déposées dans les pores d'un moule en alumine suivant différents modèles comme l'illustre la Figure 1-5. Les tubes ainsi formés sont alors fonctionnalisés puis modifiés par des oligonucléotides cibles. L'avantage de cette technologie réside dans le « codage » intrinsèque des particules, grâce à la différence de réflectivité des bandes de métal adjacentes, permettant la génération de plusieurs milliers de codages. Dans cette étude en particulier, des tubes de 9 μm composés de 11 bandes métalliques d'or et d'argent sont utilisés, portant le nombre de combinaisons différentes à 1056. Les auteurs ont ici démontré le potentiel de ces supports pour le génotypage haut-débit de polymorphismes d'un nucléotide dans la famille du cytochrome P450 (Sha *et al.* 2006).

3. TECHNIQUES DE FABRICATION

La fabrication de puces requiert avant toute chose la sélection de sondes adaptées à l'application recherchée, et leur préparation en vue de leur immobilisation. Cette étape présente différentes exigences selon qu'il s'agisse de sondes oligonucléotidiques, protéiques, ou encore de petites molécules. De plus, la préparation peut se faire extemporanément de la fabrication de la puce, ou bien *in situ*, ce qui présente parfois un avantage non négligeable. Ces modes de synthèse seront décrits en fonction du type de sonde. L'étape suivante consiste en la génération d'une matrice de ces sondes sur le support. Différentes méthodes pourront être utilisées, et sont déterminées en fonction du type de support choisi.

3.1. SYNTHÈSE DES SONDES IN SITU

3.1.1. SYNTHÈSE DE SONDES PROTÉIQUES

Les protéines utilisées pour la réalisation de biopuces doivent être le plus possible préservées par rapport à leur conformation *in vivo*, pour qu'elles puissent interagir de façon optimale sur les puces. Elles doivent donc conserver leur conformation native, la structure tridimensionnelle ayant en effet un grand rôle dans le maintien des interactions. Il est aussi nécessaire qu'elles conservent leur fonction biologique. Les différentes méthodes de préparation des protéines présentent chacune leurs avantages, et il convient de choisir la méthode la plus adaptée à l'utilisation prévue.

Il est possible de produire des protéines recombinantes possédant une étiquette, plus couramment appelée *tag*, située à l'une des extrémités de la protéine. Ce *tag* a plusieurs fonctions, il peut permettre de purifier toutes les protéines selon un protocole unique, puis de les immobiliser sur le support selon le même principe. La production du *tag* se fait en même temps que celle de la protéine : on réalise une construction génétique en utilisant l'ADNc codant pour la protéine à produire, juxtaposé à une séquence codant pour le *tag*, soit en présence de la machinerie de traduction soit dans un hôte (bactérien par exemple) qui permettra la traduction en protéine. L'utilisation d'ADN complémentaire permet de s'affranchir de l'étape d'épissage. Cette technique a cependant un inconvénient majeur : les modifications post-traductionnelles ayant lieu sur la protéine *in vivo* ne seront pas toujours les mêmes que celles effectuées sur la protéine recombinante. Cela peut poser un problème pour la reconnaissance de la protéine par sa cible. En effet, si l'interaction se fait normalement avec une partie de la protéine qui a subi une modification post-traductionnelle et que celle-ci n'a pas eu lieu sur la protéine recombinante, les interactions présentes *in vivo* n'auront pas lieu. Les *tags* les plus fréquemment utilisés sont la Glutathion S-transférase (GST) et une séquence poly histidine de six résidus (6-his). La GST a pour substrat le glutathion et le *tag* 6-his peut se lier par chélation à un complexe acide nitriloacétique-nickel. Ils permettent tous les deux de purifier et d'immobiliser la protéine.

Il est possible de produire les protéines recombinantes modifiées par un *tag* en réalisant cette étape *in situ*, comme dans les méthodes décrites ci-après. Cette méthode a comme principal avantage

d'affranchir l'utilisateur de toute étape de purification préalable. En effet, les protéines sont produites à la surface de la puce, et sont directement immobilisées grâce à un système de capture spécifique (He et al. 2008b).

3.1.1.1. METHODE PISA

Dans la méthode PISA (*protein in situ array*, production de matrice de protéine *in situ*), les protéines sont fabriquées à partir de brins d'ADN en solution, et sont liées telles quelles au support grâce à l'affinité de leur *tag* pour la surface. Les protéines sont exprimées en parallèle *in vitro*, à l'aide de lysat cellulaire contenant les éléments clés de la transcription et de la traduction. L'élément important de cette méthode est la présence sur le support d'agents immobilisés, permettant la capture du *tag*. Ainsi, les protéines sont fixées à la surface dès la fin de la traduction, et le lysat cellulaire peut être éliminé du support par lavage (Figure 1-6 1.). Cette méthode permet de générer des matrices de protéines à partir des fragments d'ADN présents dans les différentes solutions déposées au niveau de chaque plot. La méthode d'immobilisation plébiscitée par les auteurs dans ce cas, repose sur l'utilisation d'un *tag* 6-histidine, se fixant à un support modifié par nickel-acide nitrilotriacétique.

3.1.1.2. METHODE NAPPA

La méthode NAPPA (*nucleic acid programmable protein array*, production programmable de matrice de protéines à partir d'acides nucléiques) est basée sur la transcription et traduction à partir d'ADN immobilisés. Dans cette configuration, un mélange d'avidine et d'anticorps de capture anti-GST est immobilisé sur le support. Des plasmides biotinylés sont utilisés, codant pour des protéines de fusion avec la GST. Ceux-ci sont immobilisés sur le support par reconnaissance avidine/biotine, et permettent l'expression des protéines lorsqu'ils sont mis en présence de lysats cellulaires. Les protéines exprimées sont alors immobilisées par reconnaissance de la GST, de façon co-localisée avec l'ADN (Figure 1-6 2.). Cette méthode permet de s'affranchir de toute étape de purification, et de générer des matrices de protéines stables.

3.1.1.3. METHODE PAR CAPTURE DE POLYPEPTIDES SYNTHETISES IN SITU

Tao et Zhu ont décrit une autre méthode de fabrication de matrice de protéine par synthèse *in situ*, à l'aide non plus d'ADN mais d'une matrice d'ARNm modèle (Tao and Zhu 2006). Les ARNm sont synthétisés *in vitro*, puis leur extrémité 3' est hybridée à un ADN simple brin marqué par de la biotine et de la puromycine. Ces ARNm modifiés sont immobilisés à la surface de la puce par reconnaissance biotine/streptavidine de l'ADN, et la traduction en protéine est effectuée par le même type de système *cell free* que dans les méthodes précédentes. Le ribosome est arrêté quand il atteint la région hybridée avec le brin d'ADN, par fixation de la puromycine. La protéine ainsi synthétisée est libérée du ribosome et retenue à la surface de la puce grâce à la formation d'une liaison amide entre le groupement COOH C-terminal de la protéine et le groupement NH₂ de la puromycine. L'ARNm est ensuite éliminé par digestion enzymatique (Figure 1-6 3.). Cette méthode a l'avantage de former des matrices de plots bien définis, par la capture immédiate des protéines après synthèse.

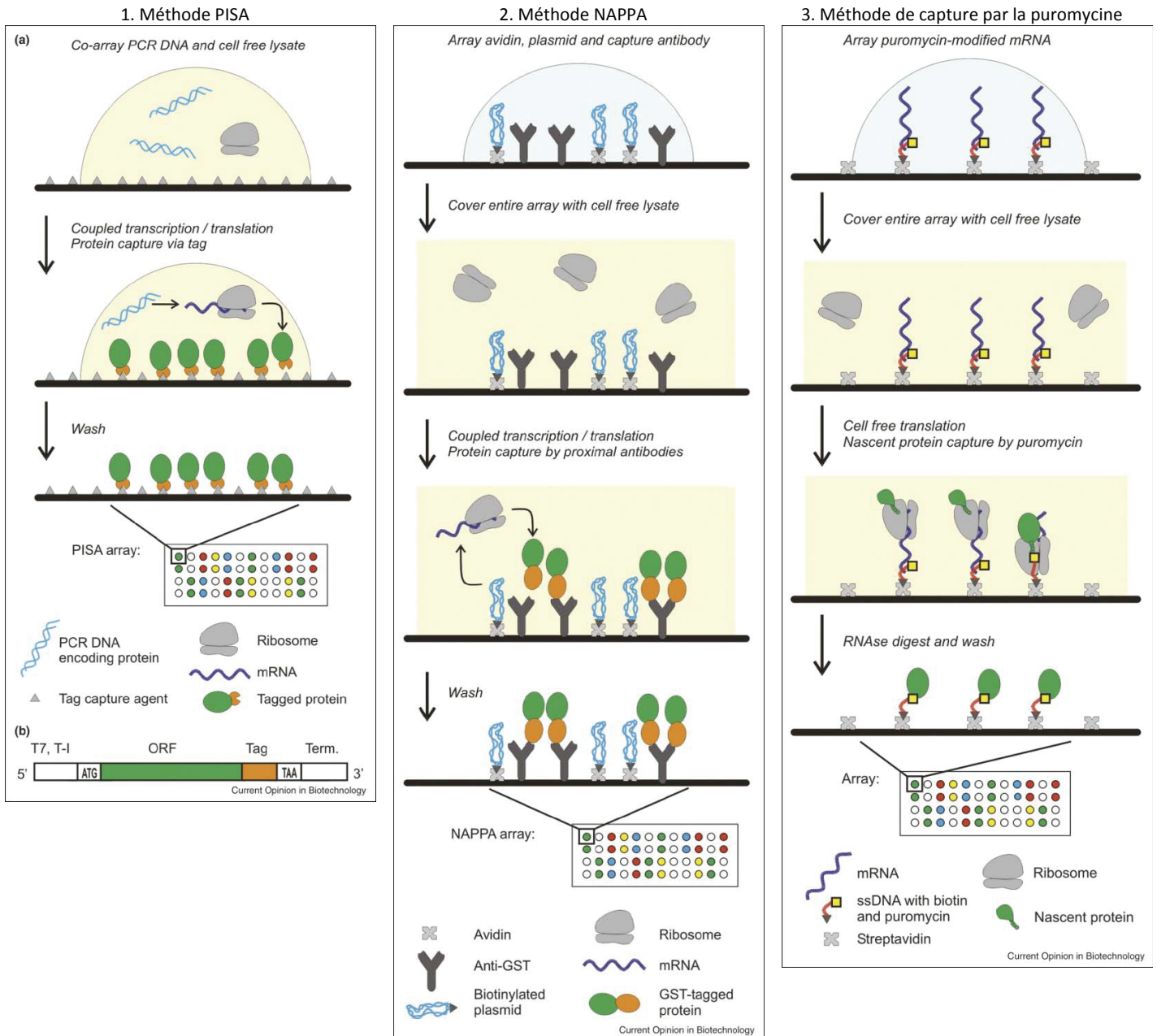


Figure 1-6. Illustration des méthodes de synthèse de sondes protéiques in situ
(Extrait de He *et al.* 2008b)

3.1.1.4. METHODE DAPA

La méthode DAPA (*DNA Array to Protein Array*, d'une matrice ADN à une matrice protéique) est caractérisée par « l'impression » de matrice de protéine sur demande, à partir d'une matrice ADN modèle (Stoevesandt *et al.* 2011). Les constructions génétiques codant pour des protéines taguées sont immobilisées sur une lame de verre fonctionnalisée. La surface de ce support est ensuite assemblée avec

une seconde lame, modifiée par la sonde correspondant au *tag*. Une membrane imprégnée d'un système de transcription-traduction *in vitro*, tel qu'un lysat cellulaire, est positionnée entre les deux lames et incubée pour la synthèse des protéines à partir de la matrice ADN. Les protéines taguées diffusent alors à travers la membrane jusqu'à la lame de capture, et, en s'y fixant, forment la matrice de protéine correspondant à la matrice d'ADN modèle (Figure 1-7). Cette méthode présente l'avantage de permettre la fabrication de nombreuses matrices de protéines à partir d'une seule lame modèle (He *et al.* 2008a).

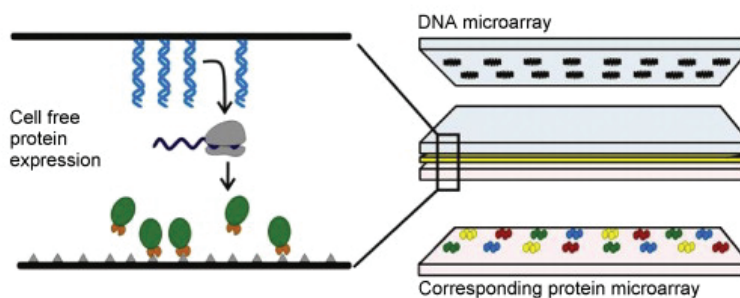


Figure 1-7. Schéma de principe de la méthode DAPA
(Extrait de Stoevesandt *et al.* 2011)

3.1.2. SYNTHÈSE DE SONDAS PEPTIDIQUES

L'activité biologique des protéines est parfois conservée dans une partie plus courte de sa séquence, codant pour des peptides qui peuvent être synthétisés par voie chimique. Pour une utilisation donnée et par rapport à une activité biologique recherchée, il est possible d'utiliser ces fragments protéiques dans la réalisation de biopuces. Les puces à peptides sont plus simples à réaliser car les molécules immobilisées présentent une plus grande stabilité. Ces puces sont surtout utilisées afin d'identifier les zones d'interactions d'une protéine avec une cible, mais aussi pour déterminer la spécificité des anticorps. Une autre application concerne l'analyse d'une activité enzymatique, notamment de certaines kinases et protéases. En 1991, Fodor et ses collègues ont développé la première puce à peptides, synthétisés *in situ* par photolithographie. Cette méthode implique l'utilisation de groupements photolabiles qui permettent la déprotection localisée à l'aide de masques, de l'acide aminé N-terminal lors de l'illumination par laser. En utilisant cette technique, ils ont réussi la synthèse de plus d'un millier de sondes peptidiques sous la forme d'une matrice sur un support de verre (Fodor *et al.* 1991).

Une seconde méthode, plus simple, a été décrite par Frank en 2002. C'est la technique appelée « SPOT », pour laquelle une série d'acides aminés activés sont mécaniquement déposés sur une surface poreuse, construisant ainsi les peptides désirés de façon séquentielle. Cette technique étant basée sur une synthèse chimique conventionnelle est donc plus accessible en termes d'implémentation (Frank 2002).

Li et son équipe ont décrit ensuite une nouvelle approche de synthèse *in situ* basée sur une construction peptidique cyclique, qui permet de s'affranchir de l'utilisation de masques. Cette procédure implique la déprotection de groupements pour l'addition de chaînes latérales à une molécule de base synthétisée au

préalable et déposée sur une lame de façon uniforme. Une banque de peptides peut ainsi être synthétisée par photolithographie sans utilisation de masques, par la photo-déprotection successive et localisée à l'aide de micro-miroirs contrôlés par ordinateur (Li *et al.* 2005).

Enfin, une méthode différente de synthèse *in situ* a été décrite par Bischoff et son équipe, dans laquelle les amino acides sont distribués dans un solvant sous forme de poudre (toner) et imprimés sur des lames de verre par une imprimante laser, avec une taille de plot de l'ordre de 190 μm . Après impression, les lames sont chauffées jusqu'à fonte des particules d'encre, permettant la formation des peptides. Ce procédé peut également être réalisé sur des puces électroniques, sur lesquelles les particules de monomères activés sont dirigées à l'aide d'un champ électromagnétique à des positions précises de greffage, permettant ainsi d'obtenir des plots de 20 μm environ (Stadler *et al.* 2008).

3.1.3. SYNTHÈSE DE SONDES OLIGONUCLÉOTIDIQUES

La méthode décrite pour la synthèse de peptide *in situ* par photolithographie a ensuite été appliquée à la synthèse d'oligonucléotides par le même groupe de chercheurs (Lipshutz *et al.* 1999). C'est la méthode couramment utilisée par la compagnie américaine Affymetrix. La résolution du procédé photolithographique permet d'obtenir une densité de sondes très élevée : les puces produites présentent plusieurs millions de sondes sur 1,28 cm^2 correspondant à des zones d'immobilisation inférieures à 10 μm (Dufva 2005).

3.1.4. SYNTHÈSE DE PETITES MOLECULES SONDES

La synthèse « SPOT », utilisée pour les peptides, a été adaptée à la synthèse de petites molécules telles que des triazines, directement à la surface de supports membranaires (Scharn *et al.* 2000). Dans cette étude, Germeroth et son équipe ont synthétisé une banque de triazines à la surface de membranes de cellulose et polypropylène amino-fonctionnalisées.

Schreiber et son équipe, déjà cités pour avoir développé les premières puces à petites molécules, ont utilisé une approche de synthèse *diversity oriented* (DOS) (Kuruvilla *et al.* 2002). Les molécules sont préparées en utilisant une méthode combinatoire appelée « *one-bead one-compound* » (une bille, un composé), développée au départ pour la synthèse peptidique. Cette méthode permet la préparation de nombreux composés différents, et leur immobilisation directe sur une bille. Les billes modifiées sont ensuite utilisées pour la création de matrices de petites molécules, immobilisées à l'aide de différentes chimies de surface après clivage de la bille porteuse.

3.2. DEPOT DE SOLUTION DE SONDES

Il existe différentes techniques de dépôt permettant de fabriquer des matrices de plots. Dans tous les cas, de faibles volumes de solutions contenant les sondes sont déposés afin de former des matrices pour l'analyse multiparamétrique d'un grand nombre de cibles. Toutes les techniques de fabrication de puce, largement robotisées, ciblent le même objectif : le dépôt uniforme de faibles quantités de molécules

sondes, en minimisant le volume de solution nécessaire au dépôt, ainsi que le coût, et en prévenant de tout risque de contamination entre sondes. On distingue alors les techniques de dépôt « contact » et « non-contact », décrites dans les paragraphes qui suivent (Barbulovic-Nad *et al.* 2006).

3.2.1. DEPOT CONTACT

Les méthodes par contact sont utilisées pour former des matrices par contact direct entre l'outil de dépôt et le support. Ces technologies sont basées sur l'utilisation de pointes, pleines ou creuses, ou sur des micro-tampons, permettant le dépôt en série ou en parallèle (plus difficilement), de différentes solutions sondes.

3.2.1.1. DEPOT CONTACT A L'AIDE DE POINTES

Le prélèvement de solution est effectué en trempant de façon itérative une pointe ou un ensemble de pointes dans les solutions sondes. Lors de l'utilisation de pointes pleines, il est nécessaire de recharger la pointe pour chaque nouveau dépôt. Des pointes creuses sont également utilisées, permettant d'effectuer plusieurs dépôts avec un même prélèvement : la solution est chargée dans la pointe par capillarité, puis déposée par contact avec le support, et l'opération peut être répétée plusieurs fois, avant lavage de la pointe pour dépôt d'une nouvelle solution. Le diamètre des plots obtenus avec ces méthodes dépend des propriétés de la surface et de la solution déposée, ainsi que de la géométrie de la pointe. Cette technique a l'avantage de la simplicité, mais en contrepartie, elle présente des risques de contaminations et d'endommagements de la surface.

3.2.1.2. DEPOT CONTACT A L'AIDE DE MICRO-TAMPONS

L'utilisation de micro-tampons permet le dépôt de centaines de plots en parallèle, permettant la fabrication haut-débit de matrices. Le procédé mis en jeu est simple et peu coûteux, basé sur une technique de lithographie douce. Un échantillon est adsorbé à la surface d'un tampon modèle, puis est transféré sur le support désiré par contact physique. Les matériaux élastomériques tels que le PDMS permettent un bon contact, et forment généralement ce type de tampon. Cette méthode a été développée par le groupe de Whiteside (Xia and Whitesides 1998), et a été largement reprise et modifiée pour différentes applications. Cette technologie a par exemple été mise en œuvre pour l'impression de protéines sur verre et sur PDMS (Marquette *et al.* 2008).

3.2.1.3. DEPOT CONTACT A L'AIDE DE NANO-POINTES

La *dip-pen* nanolithographie est une autre méthode de dépôt, décrite en 1999 par Piner *et al.* (Piner *et al.* 1999). Elle utilise la pointe modifiée d'un microscope à force atomique, qui contient la solution de sondes à déposer, pour dessiner des motifs à l'échelle microscopique sur un support. Dans l'étude réalisée par Piner *et al.*, des sondes thiolées ont été immobilisées sur un support d'or sous la forme de matrices de 25 plots de 0,46 μm de diamètre et espacés de 0,54 μm . Cette méthode permet donc d'atteindre une résolution de dépôt supérieure à celle obtenue avec les méthodes de photolithographie,

et comparable à celle obtenue avec d'autres techniques lithographiques plus coûteuses et sophistiquées telles que la lithographie à faisceau d'électrons (Ginger *et al.* 2004).

3.2.2. DEPOT NON CONTACT

3.2.2.1. ELECTROSPRAY

Cette technique de dépôt non-contact, consiste à soumettre les protéines en solution à un champ électrique intense, ce qui induit la formation de microgouttelettes qui sèchent instantanément. Ceci préserve la structure et la fonction des protéines en conservant leur solubilité car elles ne sont de cette façon pas stockées en milieu humide. Avseenko *et al.* ont par exemple utilisé cette technique pour immobiliser une matrice d'antigènes sur des supports d'aluminium ayant subi différentes modifications. Les performances de ce système ont ensuite été évaluées pour la détection d'anticorps par immunoessai (Avseenko *et al.* 2001).

3.2.2.2. SYSTEME « D'IMPRESSION » A L'AIDE DE POINTE

Cette technologie, basée sur un système thermique ou piézoélectrique, consiste à déposer des gouttes d'échantillon de quelques centaines de picolitres sur la surface de la puce sans que les aiguilles ne touchent celle-ci. Cette technique est flexible, très reproductible et les plots produits sont bien uniformes. Elle évite les risques de contamination, par l'absence de contact entre la pointe et la surface, ainsi que le risque d'abîmer les aiguilles sur des surfaces qui ne sont pas obligatoirement parfaitement planes. L'éjection de la goutte peut être réalisée à l'aide de différents types de systèmes. Le premier concerne les impressions à « jet d'encre », lors desquelles la solution de dépôt est chauffée jusqu'à une température avoisinant 200°C, permettant l'évaporation d'un petit volume « d'encre » de sondes, qui conduit alors à la formation d'une goutte éjectée par la pointe. L'autre système permet l'éjection de la goutte grâce à la vibration d'une membrane piézoélectrique, évitant ainsi toute augmentation de température.

3.2.3. ELECTROADRESSAGE

Les techniques d'électroadressage de molécules sondes sont réalisées sur des supports conducteurs, par l'application d'un potentiel électrochimique. Ces méthodes ne requièrent pas l'utilisation d'un robot de dépôt, appareillage coûteux, et permettent une immobilisation localisée lors de l'application du potentiel sur des réseaux d'électrodes.

3.2.3.1. ELECTROREDUCTION DE SELS DE DIAZONIUM

Cette technique consiste à fixer covalamment à la protéine un groupement chimique qui est ensuite soumis à une électroréduction. En appliquant une différence de potentiel entre la surface du support et une électrode de référence, il est possible d'adresser la fixation d'une protéine en un point précis de la puce. En 2005, Corgier et ses collègues ont présenté une approche innovante basée sur la modification

d'immunoglobulines par des dérivés anilines, en l'occurrence du 4-carboxyméthylaniline (CMA), permettant la diazotation et l'électro-adressage des protéines modifiées sur la surface d'électrodes de carbone (Corgier *et al.* 2005a). Cette méthode, résultant en un greffage covalent et localisé des protéines au support est possible grâce à la réduction du diazonium en milieu acide. Cette approche est illustrée sur la Figure 1-8.

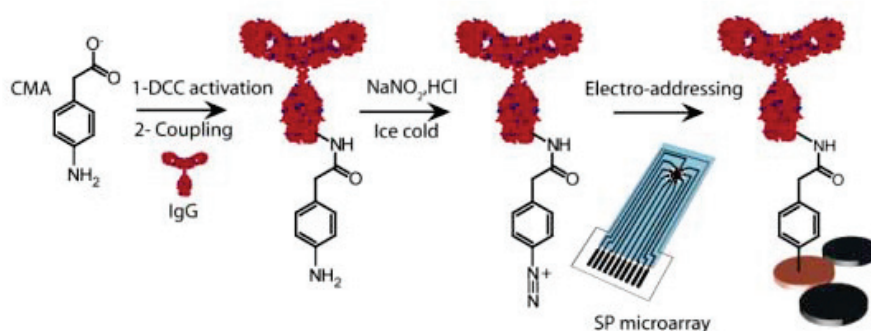


Figure 1-8. Electroaddressing d'anticorps modifiés sur la surface d'une électrode sérigraphiée
(Extrait de Corgier *et al.* 2005) CMA : 4-carboxyméthylaniline ; DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

3.2.3.2. ELECTROPOLYMERISATION

Cette seconde méthode utilise des supports polymériques conducteurs. Les molécules sondes sont immobilisées soit par piégeage mécanique lors de la formation du polymère, soit par co-polymérisation d'un mélange de monomères et de molécules sondes. Une étude réalisée par Shi et ses collègues a par exemple décrit l'utilisation de cette méthode pour la réalisation de plots de différents anticorps immobilisés dans un polymère de polypyrrole, sur la surface de microélectrodes. Ils ont ainsi pu détecter de façon sensible et spécifique la présence de différents antigènes dans des échantillons de sérum (Shi *et al.* 2006). Des réseaux d'électrodes sérigraphiées peuvent également être utilisés comme support d'électropolymérisation, comme il a été décrit pour l'immobilisation d'une protéine de capsid du virus HIV-1. Cette protéine a été pré-immobilisée sur un premier polymère, co-électropolymérisé ensuite dans du polypyrrole de façon localisée à la surface des micro-électrodes. Ce protocole a permis la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de patients, et la détermination de la séropositivité ou séronégativité des patients (Marquette *et al.* 2005).

3.2.4. UTILISATION DE BILLES FONCTIONNALISEES

Les microbilles ont déjà été décrites dans la partie 2.2.3 (page 39) comme support utilisé pour la fabrication des puces. Ces supports ont été plébiscités pour l'immobilisation de biomolécules, du fait de leur surface spécifique élevée accessible, permettant une densité de sondes immobilisées importante, et une bonne sensibilité des tests. Les microsphères, après fonctionnalisation par des molécules sondes peuvent être utilisées suivant différentes approches.

3.2.4.1. EN SUSPENSION

La technologie de puces en suspension utilise des microsphères optiquement codées, analysées par cytométrie en flux. Ces microsphères portant des récepteurs spécifiques, ont des propriétés optiques distinctes qui permettent leur identification, et ainsi leur utilisation pour des analyses multiplexes (Nolan and Sklar 2002). Le test peut alors être réalisé en suspension dans son intégralité, tant pour l'étape de capture des cibles présentes dans un échantillon que pour la détection des interactions. C'est sur ce principe que sont basées les technologies de type *x-MAP* de Luminex. Les particules *nanobarcodes*, décrites au paragraphe 2.2.4 (page 40), reposent également sur ce principe de codage optique, et les résultats des analyses multiparamétriques sont ensuite analysés par observation microscopique. Cette technologie présente l'avantage de générer plusieurs milliers de substrats uniques à partir du même support d'origine.

3.2.4.2. IMMOBILISEES SUR UNE SURFACE STRUCTUREE

Une autre approche pour l'utilisation des microsphères consiste en leur immobilisation sur un support structuré. Marquette et ses collègues ont par exemple proposé une approche d'immobilisation de microbilles de sépharose ou de latex couplées à différents types de biomolécules sondes (oligonucléotides ou protéines) dans une matrice de PDMS (Marquette and Blum 2004b). Un autre exemple de cette approche a été décrit par Walt et ses collègues, consistant en l'immobilisation de microsphères fonctionnalisées avec des brins d'ADN sur l'extrémité de faisceaux de fibres optiques. Cette construction a permis la détection multiparamétrique de cibles par mesure de fluorescence (Epstein *et al.* 2002, Epstein *et al.* 2003). La société Illumina commercialise des biopuces à oligonucléotides basées sur ce modèle, les *BeadArray*. Celles-ci sont constituées de matrices de billes de silicium de 3 μm , auto-assemblées dans des micro-puits présents à la surface de faisceaux de fibre optique ou de lames de silice.

3.2.4.3. IMMOBILISEES PAR CONTROLE MAGNETIQUE

Des microsphères magnétiques sont aussi couramment utilisées, permettant la génération de matrice de sondes auto-formée par contrôle magnétique. Différents exemple de cette technologie ont déjà été évoqués au paragraphe 2.2.3 (page 39).

4. STRATEGIES D'IMMOBILISATION

L'immobilisation des sondes sur le support est une étape critique dont dépendra l'efficacité de la puce. En effet, le principe de fonctionnement d'une puce repose sur la détection d'interactions entre une sonde et sa cible, il faut donc que cette interaction soit possible sur la puce. Pour cela, différents paramètres sont à prendre en compte : si la sonde immobilisée est une protéine par exemple, sa structure native doit être conservée pour garder ses propriétés de structure et de fonction. De plus, l'accessibilité des sondes aux molécules cibles est indispensable pour le bon fonctionnement de la puce. Pour cela, plusieurs types d'immobilisation sont utilisés (Figure 1-9), et vont être brièvement décrits ici.

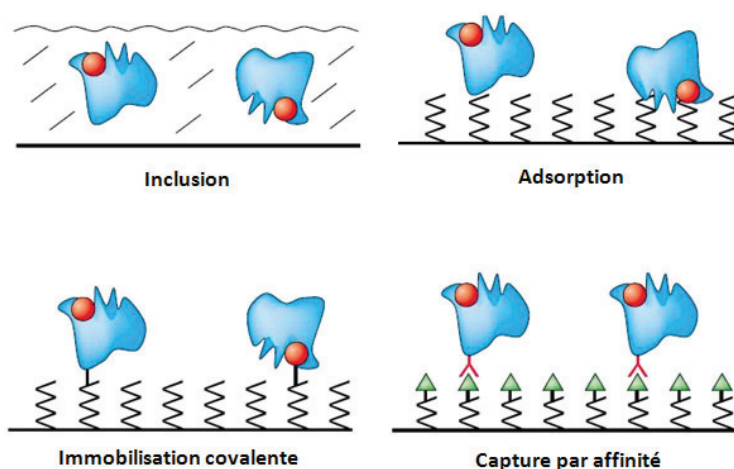


Figure 1-9. Modes d'immobilisation utilisés dans la préparation de biopuces

4.1. ADSORPTION

L'immobilisation par adsorption met en jeu principalement des interactions ioniques, polaires, hydrophobes, interactions de Van der Waals ou encore des liaisons hydrogènes entre la molécule sonde et le support par l'intermédiaire d'une surface activée. Les forces effectivement impliquées dans l'interaction dépendent de la surface utilisée. C'est une immobilisation simple, rapide et généralement peu dénaturante (sauf en cas d'interaction hydrophobe) qui permet une fixation non covalente des protéines et autres molécules sondes. Elle permet d'obtenir une couche de sondes hétérogène et non-orientée, du fait des nombreux contacts possibles sous différentes orientations que les molécules peuvent former afin de minimiser les interactions répulsives avec le substrat.

La physisorption aléatoire sur la surface de microplaques de polystyrène hydrophobe est de loin le procédé le plus utilisé pour l'immobilisation de protéines. C'est l'immobilisation mise en jeu classiquement pour les tests de type ELISA. Les stratégies d'adsorption sont classiquement utilisées avec des supports à 3 dimensions. Par exemple, des membranes de polypropylène modifiées par des polyaniline permettent une adhésion grâce aux interactions électrostatiques et hydrophobes combinées et ont démontré une haute affinité et compatibilité avec différentes protéines (Piletsky *et al.* 2003). Les supports membranaires sont eux aussi très utilisés. L'adsorption de protéines sur ces surfaces est en

effet bien connues, du fait de leur utilisation en western blot et aux outils diagnostic sur membranes, déjà décrits dans le paragraphe concernant ce type de support. Les membranes de nitrocellulose par exemple sont fréquemment utilisées pour l'immobilisation de biomolécules de façon stable et dense. Les interactions mises en jeu seraient majoritairement hydrophobes, mais aussi électrostatiques (Cretich *et al.* 2010).

Le principal inconvénient lié à cette stratégie d'immobilisation est le risque de désorption lors de variations de pH, de température, ou de force ionique, ce qui limite la stabilité et la durée d'utilisation des puces à protéines conçues avec ce mode d'immobilisation. De plus, les risques d'adsorption non spécifiques lors d'utilisation de la puce sont assez élevés et il est nécessaire de les limiter afin d'obtenir le meilleur résultat possible en terme de rapport signal spécifique/non-spécifique.

4.2. INCLUSION

Cette méthode consiste à piéger les molécules sondes dans un gel insoluble comme le polyacrylamide ou l'agarose. La sonde se trouve ainsi mécaniquement retenue dans les matrices polymériques. Les mailles de la matrice assurent la rétention de la sonde protéique par exemple, tout en permettant la diffusion des ligands et des réactifs. Cette méthode permet une bonne conservation de la conformation et de l'activité de la protéine. Cette technique est cependant limitée par la taille des pores du gel. En effet, les protéines de faible poids moléculaires, et, à fortiori les petites molécules sondes ne pourront pas être retenues par des mailles trop lâches. Un développement récent de cette méthode est la fonctionnalisation des matrices tridimensionnelles par des groupements chimiques qui pourront fixer la protéine en créant des liaisons covalentes (Charles *et al.* 2004).

L'inclusion peut également consister en un procédé de co-réticulation de la sonde dans une matrice, constituée d'autres molécules telle que la BSA ou dans du polyéthylène glycol. Cette réaction est effectuée le plus souvent par des composés tels que le glutaraldéhyde (Amine *et al.* 2006).

4.3. CAPTURE PAR AFFINITE

Ces techniques d'immobilisation utilisent des interactions d'affinité spécifiques entre des molécules préalablement fixées au support et les molécules sondes à immobiliser. Cette stratégie permet d'obtenir une immobilisation orientée. Les méthodes de capture par affinité les plus utilisées vont être décrites dans cette partie.

4.3.1. UTILISATION D'UN MARQUAGE DE LA SONDE

4.3.1.1. SYSTEME AVIDINE/BIOTINE

La sonde à immobiliser peut être « marquée » par un élément présentant un système de reconnaissance. Ainsi, la fixation de biotine à une protéine par exemple permet son immobilisation sur un support fonctionnalisé par de la streptavidine ou de l'avidine (Figure 1-10). Cette reconnaissance est largement employée pour ce type d'immobilisation, du fait de la très forte affinité entre ces deux

molécules ($K_D = 10^{-15}$ M), et peut également être exploitée dans l'autre sens (marquage par la streptavidine, et immobilisation sur un support biotinylé). L'avidine est une glycoprotéine soluble dans les solutions aqueuses et stable sur une large gamme de pH et de température, la streptavidine est une protéine tétramérique très proche de l'avidine. La formation de la liaison est très rapide et peu sensible aux variations de pH, de température, aux solvants organiques, ou encore à la protéolyse enzymatique. La biotine, ou vitamine H est présente naturellement dans toutes les cellules. La présence des deux cycles est requise pour l'interaction avec l'avidine, alors que le groupement carboxyl de la chaîne latérale n'est pas impliqué, et peut donc être modifié afin de générer un groupement réactif pour la conjugaison (le groupement NHS est le plus utilisé pour la biotinylation ciblée sur des groupements aminés, mais un groupement hydrazide peut également être utilisé pour une liaison sur un groupement carboxyle par exemple). Comme c'est une petite molécule, son couplage avec des macromolécules n'affecte ni leur taille, ni leur conformation, ni leur fonctionnalité (Rusmini *et al.* 2007). Ce système de reconnaissance peut également être utilisé pour l'immobilisation de particules de plus grande taille, telles que des microsphères de polystyrène de 1 μm de diamètre, comme il a été décrit par Andersson en 2002. De cette façon, les billes, support d'immobilisation de molécules sondes, marquées par de la streptavidine, sont immobilisées sur un support fonctionnalisé avec de la biotine. Ainsi, l'immobilisation des sondes présente une grande stabilité et une forte densité (Andersson *et al.* 2002).

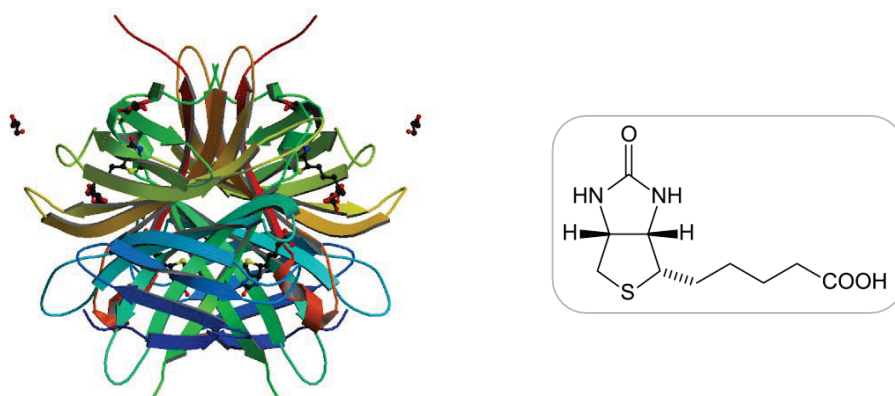


Figure 1-10. Structure de la streptavidine, complexée avec quatre biotines
(source : protein data bank, structure 3RY2) encart : structure de la biotine

4.3.1.2. ETIQUETTE POLY-HISTIDINE

Une alternative développée par Zhu et ses collaborateurs consiste à synthétiser des protéines de fusion contenant à leur extrémité un *tag*, déjà décrit dans le paragraphe 3.1.1 (page 41). Ce *tag* est placé à une position définie sur les protéines, de préférence éloigné du site actif de reconnaissance, de façon à éviter toute perturbation de l'interaction avec un ligand.

Le *tag* poly-histidine (6-his) est le plus populaire, présentant des avantages de par sa petite taille, sa compatibilité avec des solvants organiques, sa faible immunogénicité et l'efficacité des procédés de purification en conditions natives ou dénaturantes. Les protéines présentant un *tag* 6-his à leur extrémité N- ou C-terminale peuvent ainsi être immobilisées par la formation de complexes avec des ions nickel. En utilisant des surfaces fonctionnalisées par de l'acide nitriloacétique (NTA) par exemple, chargé d'un ion métallique divalent, généralement Ni^{2+} . La chélation entre le NTA et le *tag* est réalisée en impliquant l'ion Ni^{2+} dans une coordination octaédrique, avec deux valences occupées par deux groupements imidazole du *tag* 6-his et quatre ligands du NTA, comme illustré sur la Figure 1-11. La fabrication de puces fonctionnalisées par du NTA peut elle-même être réalisée suivant différentes stratégies, le plus souvent par greffage covalent. L'avantage de cette méthode est sa haute spécificité mais aussi sa réversibilité. En effet, la libération des histidines peut être réalisée par l'ajout d'un ligand compétitif tel que l'imidazole, et une autre approche consiste à utiliser un agent complexant tel que l'EDTA, permettant de chélater le Nickel du NTA. Cette propriété est un avantage important, les puces pouvant ainsi être ré-utilisées et modifiées aisément. De plus, étant très utilisée, la fonctionnalisation des protéines par un *tag* 6-his est disponible commercialement pour un grand nombre d'entre elles. Néanmoins, ce système présente des inconvénients, qui résident dans l'absorption métal-dépendante non spécifique de protéines à la surface, ainsi que dans le risque de dissociation des protéines due à une affinité relativement faible du *tag* 6-his pour le complexe Ni-NTA avec un $K_D = 10^{-6}\text{M}$.

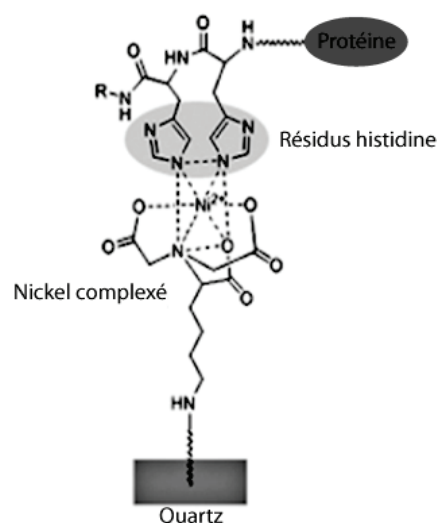


Figure 1-11. Immobilisation d'une protéine par son étiquette 6-his
(Extrait de Jonkheijm *et al.*, 2008)

4.3.1.3. HYBRIDATION D'OLIGONUCLEOTIDES

L'immobilisation dirigée par l'hybridation d'oligonucléotides complémentaire offre une solution d'immobilisation pour différents types de sondes grâce à la très haute stabilité des oligonucléotides et à la sélectivité unique de l'appariement des bases. La fabrication des puces pour ce type de système repose sur la technologie bien établie des puces à ADN, pour laquelle les sondes oligonucléotidiques sont matricées sur le support. Les molécules sondes sont marquées par des oligonucléotides complémentaires à ceux présents en surface, et incubées sur le support afin de procéder à l'hybridation spécifique sur les plots appropriés du support. Cette stratégie a été développée récemment et des complications associées, dues au greffage d'un oligonucléotide sur des protéines ont été soulevées. Différentes stratégies ont là encore été mises en place, telle que l'utilisation de conjugués semi-synthétiques d'acides nucléiques et de protéines, immobilisées sur des puces à ADN par le groupe de

Niemeyer, dans le but de générer des puces à protéines dédiées au diagnostic (Wacker and Niemeyer 2004).

4.3.2. UTILISATION DE LA RECONNAISSANCE DES PROTEINES A ET G

L'immobilisation d'anticorps peut être réalisée à l'aide de l'interaction spécifique existant entre la région Fc constante des immunoglobulines G et la protéine A ou la protéine G. Ce type d'immobilisation permet d'assurer l'accessibilité du site de reconnaissance de l'anticorps, étant situé sur la région variable Fab, pour l'interaction avec les antigènes à détecter. Une difficulté liée à l'utilisation de ce système, réside dans la nécessité d'orienter la protéine A afin de permettre l'interaction avec les IgG. Pour pallier cela, différentes approches ont été présentées, comme par exemple l'utilisation d'une protéine A synthétisée avec un *tag* 6-histidine à son extrémité C-terminale par Johnson et ses collègues, permettant ainsi l'immobilisation orientée par interaction avec une surface fonctionnalisée par du Ni-NTA (Johnson *et al.* 2003).

4.3.3. UTILISATION D'APTAMERES

Enfin, l'utilisation d'aptamères est une autre méthode d'immobilisation par affinité. Ce sont des oligonucléotides simples brins qui permettent une reconnaissance spécifique et de haute affinité des cibles, basée sur des interactions hydrophobes et électrostatiques ainsi que sur des liaisons hydrogène plutôt que sur l'appariement Watson-Crick des bases. Ces molécules sont issues d'une technique de sélection *in vitro* à partir d'une banque de séquences d'acides nucléiques aléatoires, à partir de laquelle les molécules sont sélectionnées pour leur capacité à reconnaître spécifiquement une molécule cible et à la fixer avec une grande affinité de liaison. Cette technique, mimant un procédé de sélection naturelle, a été décrite en 1990 et appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment, évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel). Les aptamères peuvent être sélectionnés contre un grand nombre de type de molécules cibles différentes, telles que des ions métalliques, des protéines, des toxines ou encore des organismes entiers. Souvent comparées aux anticorps du fait de leur mode de reconnaissance, ces molécules présentent de nombreux avantages liés à leur taille très inférieure, à leur mode de production, à leur grande stabilité, ou encore à la possibilité de modification chimique, réalisée sans altération de la qualité des interactions. Des photoaptamères, développés par la société Somalogic, permettent en plus de la capture par affinité, de créer un pontage covalent sous l'action d'un rayonnement UV. Cette technique est encore peu utilisée mais elle offre une spécificité accrue et un très bon rapport signal/bruit (Bock *et al.* 2004).

4.4. IMMOBILISATION COVALENTE

Cette stratégie d'immobilisation est basée sur la formation de liaisons covalentes, qui assurent une fixation très stable des molécules sondes sur le support. Elle implique généralement une fonctionnalisation préalable du support, générant des groupements fonctionnels réactifs permettant la formation des liaisons avec les sondes. Les sondes protéiques par exemple peuvent être immobilisées par une liaison générée avec un groupement de la chaîne latérale des acides aminés. Les groupements disponibles dépendent des acides aminés présents à la surface de la protéine, et requièrent différentes

fonctionnalisation du support, résumées dans le Tableau 1-1. L'immobilisation d'oligonucléotides nécessite généralement la synthèse d'un groupement dédié au greffage covalent. Pour les autres types de sondes, telles que les molécules organiques de faible poids moléculaire, d'autres groupements peuvent également être impliqués. Différentes approches d'immobilisation covalente vont être décrites ici.

Tableau 1-1. Fonctions impliquées dans la création de liaisons covalentes et surfaces associées

Groupement présenté	Acide aminé impliqué	Surfaces requises
-NH ₂	Lys Extrémité N-term	Acide carboxylique Ester activé Epoxy Aldéhyde
-SH	Cys	Maléimide Pyridyl disulfure Vinyl sulfone
-COOH	Asp, Glu Extrémité C-term	Amine
-OH	Ser, Thr Glycosylations	Epoxy

4.4.1. COUPLAGES COVALENTS CLASSIQUES

4.4.1.1. CHIMIE DES AMINES

La méthode d'immobilisation covalente la plus utilisée implique le groupement amine de la chaîne latérale des lysines. Ces acides aminés représentant environ 10 % des résidus d'une protéine, l'immobilisation générée par une liaison les impliquant est non-orientée et hétérogène. Classiquement, ce couplage implique des supports présentant des groupements acides carboxyliques activés par carbodiimide en présence de N-hydroxysuccinimide, et génère des liaisons amides stables. L'efficacité de l'immobilisation dépend du pH, de la concentration en protéine, de la force ionique, du temps de réaction, et ces conditions doivent être optimisées pour chaque protéine. L'immobilisation par carbodiimide a également été décrite sur des monocouches auto-assemblées (SAM) d'acide 3-mercaptopropionique et d'acide 11-mercaptoundécanoïque sur des surfaces d'or dès 1997 par Patel *et al.*, qui ont étudié l'effet de l'accessibilité de l'acide carboxylique terminal des SAM dans la réaction avec le carbodiimide et l'immobilisation d'une enzyme (Patel *et al.* 1997).

Une autre stratégie, rapportée pour la génération de puces à protéines pour la première fois par MacBeath et Schreiber et actuellement largement employée, consiste en l'utilisation de lames de verre fonctionnalisées avec des groupements aldéhydes (MacBeath and Schreiber 2000). L'interaction entre des groupements amines et aldéhydes conduit à la formation d'une base de Schiff labile, stabilisée par réduction et générant ainsi une liaison amine secondaire stable.

4.4.1.2. CHIMIE DES ACIDES CARBOXYLIQUES

Une alternative à l'utilisation des lysines pour l'immobilisation des protéines consiste en la génération de liaisons avec les groupements acides carboxyliques présentés par l'acide aspartique et par l'acide glutamique. En effet, ces acides aminés étant généralement présents à la surface des protéines, des méthodes de couplage peuvent générer une immobilisation covalente sur le support. Une stratégie de couplage efficace réside en la formation de liaisons avec des surfaces fonctionnalisées par des groupements amines, après activation des acides carboxyliques à l'aide de carbodiimides. Fernandez-Lafuente *et al.* ont utilisé cette méthode de manière innovante en 1993, en préparant des gels d'agarose contenant des groupements amine primaire, utilisés pour l'adsorption dans un premier temps d'une protéine dans un milieu de faible force ionique. L'ajout de carbodiimide permettait ensuite la transformation de l'adsorption ionique en interactions covalentes (Fernandezlafuente *et al.* 1993).

4.4.1.3. CHIMIE DES THIOLS

Les résidus cystéine contiennent un groupement thiol capable de créer naturellement des liaisons internes à la protéine pour la stabiliser, ce sont les ponts disulfures. Comme les cystéines sont présentes en faible proportion dans les protéines, l'immobilisation via cet acide aminé sera assez homogène pour un même type de protéine. Ce greffage peut être effectué par la formation de liaison thioéther avec un maléimide, ou bien par la formation de ponts disulfures avec des supports fonctionnalisés par des groupements vinyl sulfone ou disulfure (Rusmini *et al.* 2007).

4.4.2. COUPLAGES COVALENTS PAR PHOTOACTIVATION

Les méthodes de photoactivation, déjà décrites au paragraphe 3.1.2 (page 44) pour la synthèse *in situ* de sondes, impliquent l'utilisation de groupements photosensibles permettant une activation localisée de plots du support par illumination, suivie par le greffage dirigé de sondes. Ces méthodes présentent l'avantage d'une fabrication rapide des puces, ne nécessitant pas de modification chimique préalable. De plus, ces réactions peuvent être effectuées en conditions douces, sans contraintes de pH ou de température, et sont initiées par une irradiation à des longueurs d'onde autour de 350 nm, auxquelles la majorité des biomolécules sont insensibles (Blawas and Reichert 1998). Les modifications chimiques générées par cette photoactivation conduisent alors à la formation de liaisons covalentes entre le support photoréactif et la molécule sonde.

En plus des groupements photoactivables utilisés pour fonctionnaliser des supports, des espaceurs hétéro-bi-fonctionnels comportant un groupement photoactivable et un groupement chimiquement réactif peuvent être utilisés (Jonkheijm *et al.* 2008). Ces deux types de groupements sont utilisés l'un pour le greffage au support, et l'autre pour le couplage avec les molécules sondes.

4.4.3. AUTRES REACTIONS DE COUPLAGE

4.4.3.1. REACTIONS DE CYCLO-ADDITION

CHIMIE CLICK

La *click chemistry* est un type particulier de cyclo-addition, décrite pour la fonctionnalisation de surface par Bock et ses collègues en 2006. Elle est basée sur la réaction entre un groupement azide et un alkyne pour la formation d'un hétérocycle 1,2,3-triazole via une cyclo-addition dipolaire. Cette méthode a été utilisée pour le greffage covalent d'une enzyme, fonctionnalisée par des groupements azides, sur des billes d'agarose présentant des fonctions acétyléniques (Duckworth *et al.* 2006). La formation irréversible du cycle triazole est réalisée à température ambiante en présence de cuivre, ce qui peut être un inconvénient pour l'immobilisation de certaines protéines.

Waldmann *et al.* ont également employé une chimie click, la *click sulfonamide reaction*, entre des azides sulfonyl et des alkynes terminales pour immobiliser de la biotine, des sucres, des peptides et des protéines. Dans cette étude, le domaine de fixation de Ras (RBD, *Ras Binding Domain*) de la protéine cRaf1 a été modifié par une fonction alkyne terminale, puis immobilisé par ce groupement terminal sur une surface modifiée par un azide sulfonyl. Leurs expériences ont ici montré la conservation de l'activité biologique de RBD (Govindaraju *et al.* 2008).

CYCLO-ADDITION DE DIELS-ALDER

La réaction de cyclo-addition de Diels-Alder est un autre type de cyclo-addition, basée sur la formation d'un cyclohexène à partir d'un groupement alcène et d'un diène conjugué. Elle peut être effectuée dans l'eau à température ambiante, et permet ainsi l'immobilisation covalente de sondes protéiques. Houseman *et al.* ont utilisé cette méthode pour la fabrication de puces à peptides dédiées à l'évaluation de l'activité de protéines kinases. Dans cette étude, les peptides d'intérêt ont d'abord été conjugués à des cyclopentadiènes, puis immobilisés grâce à la réaction de cyclo-addition de Diels-Alder avec des groupements benzoquinones modifiant les alcanes thiols en monocouche auto-assemblée sur des surfaces d'or (Houseman *et al.* 2002).

4.4.3.2. REACTIONS DE LIGATION

LIGATION CHIMIQUE NATIVE

Cette méthode d'immobilisation repose sur une liaison thioester labile, et sa capacité à être acylée. Elle consiste en un échange entre un thio ester et le thiol d'une cystéine, suivi d'un réarrangement par transfert d'acyle générant une liaison amide. Le premier exemple de cette réaction chemo-sélective appliqué à l'immobilisation sur des surfaces a été décrit par Falsey *et al.* pour la formation de puces à peptides et petites molécules. Dans cette étude, des lames de verre ont été fonctionnalisées par des dérivés glyoxyles, qui permettent la formation de cycles thiazolidine avec le résidu cystéine N-terminal

d'une biotine, ou de peptides (Figure 1-12). Ces puces ont permis la détection par fluorescence de la fixation de protéine et de l'adhésion de cellules (Falsey *et al.* 2001).

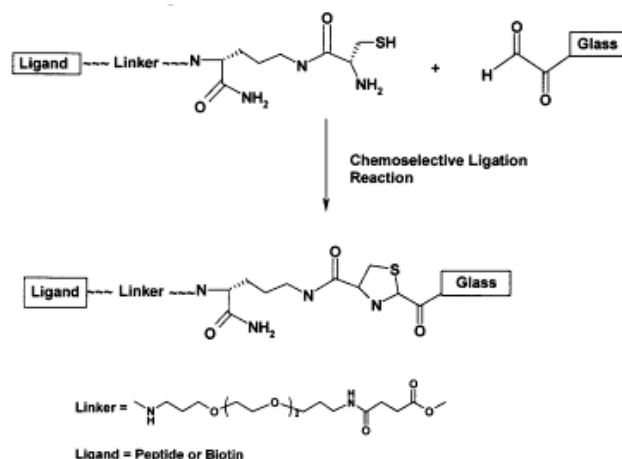


Figure 1-12. Immobilisation covalente de peptides ou de petites molécules par formation d'un cycle thiazolidine
(Extrait de Falsey *et al.* 2001)

LIGATION DE STAUDINGER

Cette méthode, développée par Bertozzi (Saxon and Bertozzi 2000) et Raines (Nilsson *et al.* 2000) permet d'obtenir une liaison amide au site de ligation mettant en jeu un phosphinothioester et un dérivé azoture. Le mécanisme réactionnel supposé fait intervenir un iminophosphorane comme intermédiaire réactionnel qui subit un - S,N - transfert d'acyle pour former l'aminophosphonium qui est alors hydrolysé. L'utilisation de la réaction de ligation de Staudinger a été appliquée en 2003 par l'équipe de Raines (Soellner *et al.* 2003) pour l'immobilisation de protéines en biopuces, et par l'équipe de Waldmann (Kohn *et al.* 2003) pour la formation de puces à petites molécules. Dans cette étude, des petites molécules fonctionnalisées par un groupement azide ont été immobilisées sur des supports de verre présentant des groupements phosphanes.

4.4.3.3. COUPLAGE VIA UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE

Hodneland *et al.* ont démontré la possibilité d'utiliser une enzyme pour immobiliser des protéines de façon orientée (Hodneland *et al.* 2002). Dans cette étude, la protéine à immobiliser a été utilisée fusionnée à une sérine estérase, la cutinase. Cette enzyme catalyse la formation d'une liaison covalente site-spécifique avec des ligands phosphonates. Une surface d'or a donc été modifiée par des monocouches auto-assemblées d'alkyle tri-éthylène glycol présentant des groupements phosphonates terminaux. Lors de la fixation d'un phosphonate au site actif de l'enzyme, le groupement hydroxyle du résidu sérine catalytique réagit pour former un pontage covalent résistant à l'hydrolyse. Le même groupe a ensuite été utilisé en 2004 cette méthode pour immobiliser des anticorps fusionnés à la cutinase (Kwon *et al.* 2004). Néanmoins, cette méthode est applicable pour l'immobilisation à l'aide d'autres enzymes. Le groupe de Johnsson a par exemple démontré l'utilisation d'une alkyltransférase fusionnée aux protéines sondes (Kindermann *et al.* 2003). Cette approche est basée sur le mécanisme de la O6-

alkylguanine-ADN alkyltransférase humaine (hAGT), qui catalyse le transfert du groupement alkyle de son substrat à un résidu cystéine. En fonctionnalisant la surface de la puce par des groupements benzyles, ce mécanisme a pu être utilisé pour l'immobilisation covalente de protéines de fusion à la hAGT (Figure 1-13).

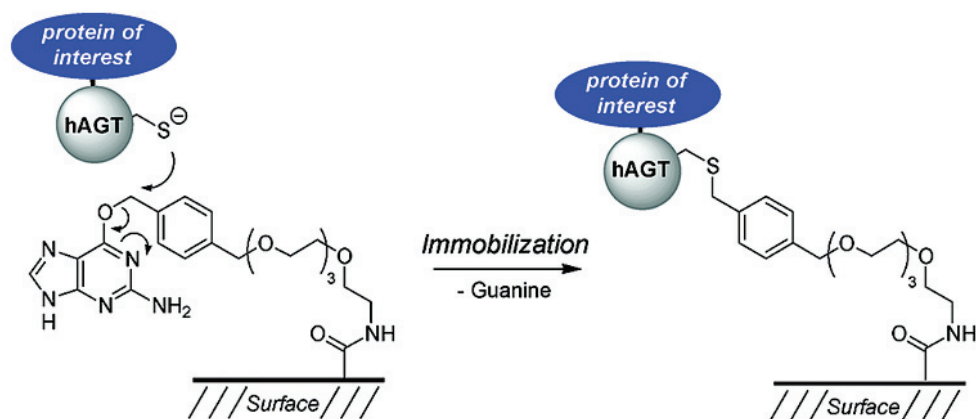


Figure 1-13. Immobilisation covalente de protéine grâce à une activité enzymatique

(Extrait de Kindermann *et al.* 2003) La protéine d'intérêt est fusionnée à la O6-alkylguanine-ADN alkyltransférase humaine, qui catalyse le transfert du groupement alkyle de son substrat (fonctionnalisant la surface) à un résidu cystéine.

5. METHODES DE DETECTION

La deuxième partie des biopuces, basées sur le principe des biocapteurs, est le transducteur. Il permet de convertir le signal physico-chimique émis par la reconnaissance spécifique du substrat en un signal électrique mesurable. On peut classer les techniques de transduction utilisées en deux catégories : les techniques utilisant un marquage (marqueur fluorescent, luminescent, ou encore radioactif) et celles sans marquage (résonance plasmonique de surface, microscopie à force atomique, système piézoélectrique). D'autres techniques de détection, comme celles basées sur des méthodes électrochimiques peuvent être utilisées avec ou sans marquage.

5.1. DETECTION AVEC MARQUAGE

5.1.1. METHODES OPTIQUES

Les méthodes optiques comme la fluorescence, la chimiluminescence, ou l'électrochimiluminescence, reposent sur la propriété de certaines molécules à émettre de la lumière. Le retour des formes excitées de ces composés à l'état fondamental produit une radiation lumineuse (Figure 1-14). Pour la détection de signaux lumineux, les transducteurs utilisés sont soit des tubes photomultiplicateurs, couplés ou non à des fibres optiques, soit des caméras CCD (Charged Coupled Device) à haute résolution spatiale, ou encore des appareillages de type scanner pour la fluorescence.

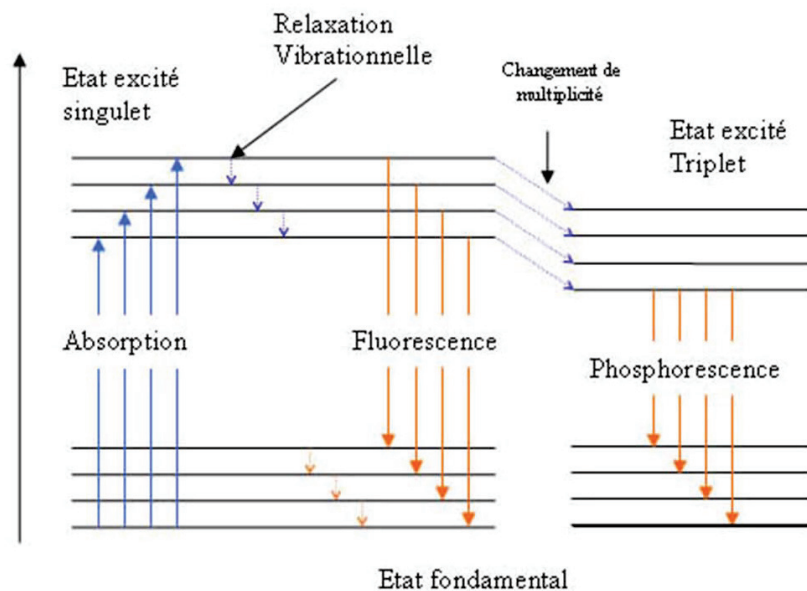


Figure 1-14. Diagramme de Jablonski simplifié

Ce diagramme représente les différents processus par lesquels un composé retourne à l'état fondamental après excitation par absorption d'un photon. Les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence sont caractérisés par l'émission de lumière.

5.1.1.1. MARQUAGE FLOUORESCENT

La fluorescence est le phénomène par lequel certaines molécules portées à un état excité par absorption d'énergie lumineuse, retournent à l'état fondamental de façon rapide en restituant une partie de l'énergie sous forme d'émission lumineuse. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration en fluorophore, ce qui permet une analyse quantitative. Il est possible d'utiliser des marquages avec différentes sondes fluorescentes, de façon à pouvoir effectuer plusieurs détections de manière simultanée. Un grand nombre de fluorophores sont aujourd'hui présents sur le marché, tels que la fluorescéine, la rhodamine, ou encore la famille des cyanines. La société Molecular probes commercialise des sondes fluorescentes les *Alexa Fluor*, numérotées selon leur longueur d'onde d'absorption, et présentant une émission à différentes longueurs d'ondes (Figure 1-15).

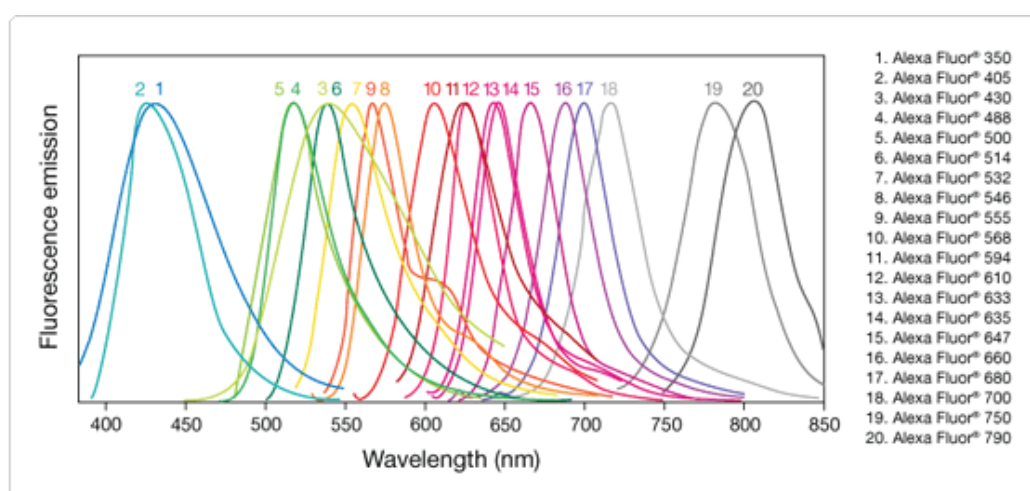


Figure 1-15. Spectres d'émission des fluorophores commerciaux Alexa Fluor®

(Extrait de www.invitrogen.com) Ces fluorophores sont numérotés selon leur longueur d'onde d'absorption, et sont caractérisées par différentes longueurs d'ondes d'émission maximale de fluorescence.

D'autres types de sondes fluorescentes ont été synthétisées, basées sur des nanocristaux semi-conducteurs (les *quantum dots*) dont la taille détermine la longueur d'onde d'émission de fluorescence. Weller et son équipe ont par exemple synthétisé des nanocristaux de sulfure de cadmium et de séléniure de cadmium, dont la longueur d'onde d'émission va du bleu pour un diamètre de 1,7 nm au rouge pour un diamètre de 6 nm (Figure 1-16). La société Can, qui commercialise des *Quantum Dots* a notamment été fondée sur la base de ces travaux. Ce type de marquage peut être très intéressant pour les systèmes de détection multiparamétrique. Cette méthode présente cependant l'inconvénient d'être dépendante des phénomènes de quenching des fluorophores, qui interviennent notamment lorsque la concentration en fluorophore est trop élevée, et qui diminuent l'intensité de fluorescence. De plus, les protéines contiennent des acides aminés qui ont des propriétés fluorescentes (Tyr, Trp et Phe), ce qui peut modifier le signal détecté. Enfin, cette méthode ne pourra pas être utilisée sur certains supports ayant une fluorescence intrinsèque induisant un bruit de fond important. Les supports de nitrocellulose par exemple ont tendance à diffuser la lumière et ne sont ainsi pas les mieux adaptés à l'utilisation de la fluorescence.



Figure 1-16. Solutions fluorescentes basées sur des Quantum Dots de différentes tailles

(Extrait du site internet du laboratoire du Professeur Weller) Les nanocristaux de sulfure de cadmium et de séléniure de cadmium présentés ici ont un diamètre de 1,7 nm (fluorescence dans le rouge) à 6 nm (fluorescence dans le bleu).

Différentes stratégies originales ont été proposées pour amplifier le signal de fluorescence. L'utilisation de la méthode de *Rolling circle amplification* (RCA) par exemple a été décrite par Lizardi *et al.* en 1998, pour la détection de mutations sur des oligonucléotides (Lizardi *et al.* 1998). Elle a ensuite été largement appliquée à la détection multiparamétrique sur biopuce. Schweitzer et son équipe l'ont utilisée par exemple pour la détection de 75 cytokines, dont les perturbations significatives ne pouvaient être mesurées avec la sensibilité obtenue sans amplification (Schweitzer *et al.* 2002). Dans cette étude, les anticorps reconnaissant les cibles sont modifiés par un primer oligonucléotidique. Un oligonucléotide circulaire s'hybride alors sur le primer de séquence complémentaire, et la réplication en boucle a lieu en présence d'ADN polymérase et de nucléotides. Un long oligonucléotide présentant la séquence complémentaire du brin circulaire est alors synthétisé, tout en restant attaché à l'anticorps. L'ajout d'un oligonucléotide complémentaire, marqué par des sondes fluorescentes permet alors la détection de l'interaction avec une amplification de la fluorescence.

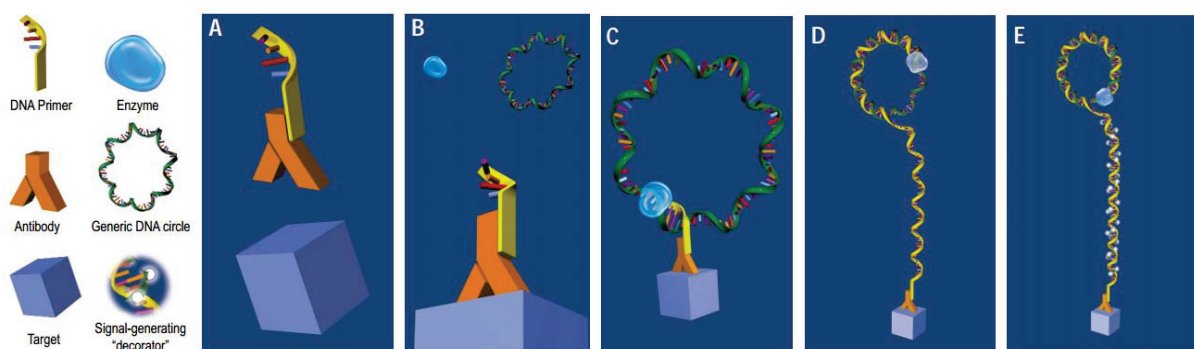


Figure 1-17. Représentation schématique d'un immunoessai avec une amplification du signal par RCA

(Extrait de Schweitzer *et al.* 2002) A. dans l'adaptation de cette méthode pour l'amplification du signal à de la reconnaissance d'une protéine, l'extrémité 5' d'un primer oligonucléotidique est attaché à un anticorps, B. le conjugué se fixe à la sonde présente sur le support, C. une molécule d'ADN circulaire s'hybride au primer par complémentarité, et la réplication en cercle a lieu en présence d'ADN polymérase et de nucléotides, D. une longue molécule d'ADN est alors synthétisée, restant attachée à l'anticorps E ce produit est finalement détecté par l'hybridation de multiples sondes fluorescentes complémentaires.

En 1996, Kramer et Tyagi ont décrit une autre méthode d'utilisation du phénomène de fluorescence, le système de balise moléculaire. Ce système repose sur l'utilisation d'une molécule oligonucléotidique simple brin formant une structure tige-boucle. La partie tige est constituée d'une séquence nucléotidique complémentaire à une cible prédéterminée, et la partie boucle est formée par l'hybridation des séquences complémentaires situées de part et d'autre de la boucle. Cet oligonucléotide est modifié à une extrémité par un fluorophore, et à l'autre par un atténuateur (ou quencheur) de fluorescence. Le fluorophore et le quencheur sont donc au départ situés à proximité l'un de l'autre. Lorsqu'une molécule cible est présente, son hybridation avec la boucle génère la séparation de la partie tige et l'éloignement des deux molécules fixées, ce qui conduit à la production du signal fluorescent (Tyagi and Kramer 1996).

5.1.1.2. MARQUAGE CHIMILUMINESCENT

La chimiluminescence est le phénomène par lequel certaines molécules amenées à un état excité par réaction chimique, retournent à l'état fondamental en restituant une partie de leur énergie sous forme d'émission de lumière. C'est une méthode aussi sensible que la fluorescence dans la mesure où celle-ci ne nécessite pas l'irradiation par une source lumineuse, ce qui réduit de manière considérable le bruit de fond. Les composés produisant de la chimiluminescence sont variés (Roda *et al.* 2000). Le luminol et ses dérivés sont très utilisés dans le domaine analytique. Oxydés par des peroxydes ils produisent dans certaines conditions de pH une émission de lumière. Cette réaction peut être catalysée par des enzymes telles que la peroxydase de raifort (HRP) ou la catalase, ainsi que par des complexes protéo-métalliques tels que l'hémoglobine ou le cytochrome c, mais également le Fe(III) et d'autres métaux. Certaines molécules sont connues pour amplifier l'intensité et le temps d'émission de la chimiluminescence du luminol. C'est le cas des phénols, des naphthols ou des amines. L'amplificateur le plus couramment utilisé est le para-iodophénol, il permet d'augmenter le rapport signal/bruit par un facteur 180 lorsqu'il est présent dans le milieu réactionnel (Thorpe and Kricka 1986).

La réaction de chimiluminescence du luminol a été particulièrement étudiée et appliquée à la détection sur biopuces. La Figure 1-18 a. illustre ce mécanisme général en milieu aqueux (Blum 1997). Dans un solvant protique en conditions alcalines, l'émission de lumière est réalisée à l'aide d'un catalyseur oxydant associé à un co-oxydant. L'utilisation de la peroxydase de raifort en présence de peroxyde d'hydrogène plutôt que celle de catalyseurs tels que le ferricyanure, présente l'avantage de permettre la réaction à des pH plus proches de la neutralité (pH 8-8,5). Cette réaction permet la production d'un aminophthalate dans un état excité, générant l'émission de photon pour retourner à un état fondamental.

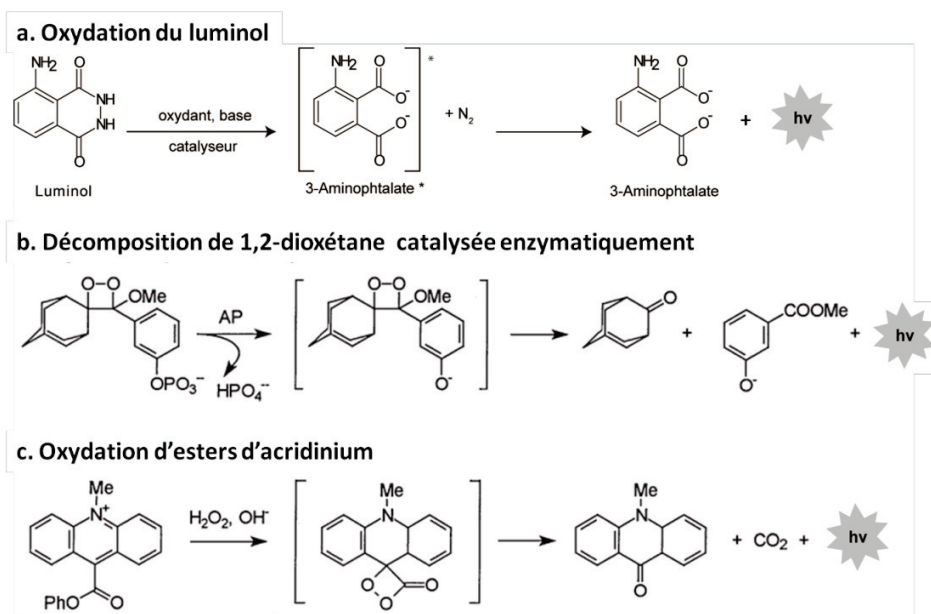


Figure 1-18. Réactions de chimiluminescence utilisées en chimie analytique
(adaptée d'après Roda *et al.* 2000)

D'autres substrats sont utilisés, dont la décomposition, catalysée ou non, mène à une émission chimiluminescente. Par exemple, l'adamantyl-1,2-dioxétane phényl-phosphate est déphosphorylé par la phosphatase alcaline pour produire un intermédiaire phénoxyde instable (Figure 1-18 b.). La décomposition de cet intermédiaire conduit alors à la formation d'un aryl ester à un état excité, émettant de la lumière (Beck and Koster 1990). Les esters d'acridinium font également partie des composés chimiluminescents les plus utilisés (Figure 1-18 c.).

5.1.1.3. MARQUAGE ELECTROCHIMILUMINESCENT

Dans cette méthode, la molécule luminescente qui émet de la lumière en retournant à l'état fondamental est précédemment portée à un état électronique excité grâce à une réaction électrochimique. Ce type de luminescence est aussi appelé chimiluminescence électro-générée. Pour ce type de marquage, il est possible d'utiliser le luminol ou le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, qui subissent une électro-oxydation et dont la transformation induit une émission de photons. Le mécanisme de la réaction impliquant le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène a été explicité en 1992 par Sakura. Ce mécanisme, assez proche de celui de la chimiluminescence catalysée par la peroxydase de raifort, est dépendant du potentiel appliqué pour l'électro-oxydation, mais également du pH du milieu (Sakura 1992). La société Meso Scale Discovery commercialise des biopuces pour le diagnostic en format plaque 96 et 384-puits, utilisant la chimiluminescence du $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ initiée électrochimiquement à l'aide d'électrodes en fond de puits.

Cette approche est peu utilisée pour le développement de tests analytiques en format biopuce. Toutefois, quelques outils ont été décrits, mettant en jeu l'électrochimiluminescence du luminol. Marquette *et al.* ont par exemple utilisé cette méthode pour la le développement de trois systèmes,

illustrés Figure 1-19 (Marquette and Blum 2004a). Ces systèmes sont basés sur un support conducteur de graphite modifié par du PDMS, dans lequel sont immobilisés des billes de sépharose. Dans le premier cas, ces billes sont colocalisées avec des enzymes pour la détection de lactate, de choline ou de glucose (trois substrats pour 3 enzymes immobilisées) (Figure 1-19 A). Dans le second, elles sont fonctionnalisées par des oligonucléotides pour la détection de cibles oligonucléotidiques complémentaires (Figure 1-19 B), et dans le troisième cas, par des antigènes pour la détection d'anticorps (Figure 1-19 C). Pour ces trois essais, la détection est réalisée grâce à la catalyse par une enzyme (immobilisée sur la surface ou greffée à une avidine reconnue par les oligonucléotides cibles biotinylés ou encore les anticorps biotinylés en compétition avec la cible), produisant du peroxyde d'hydrogène, nécessaire à l'oxydation du luminol présent en solution, et générant ainsi l'émission de photons.

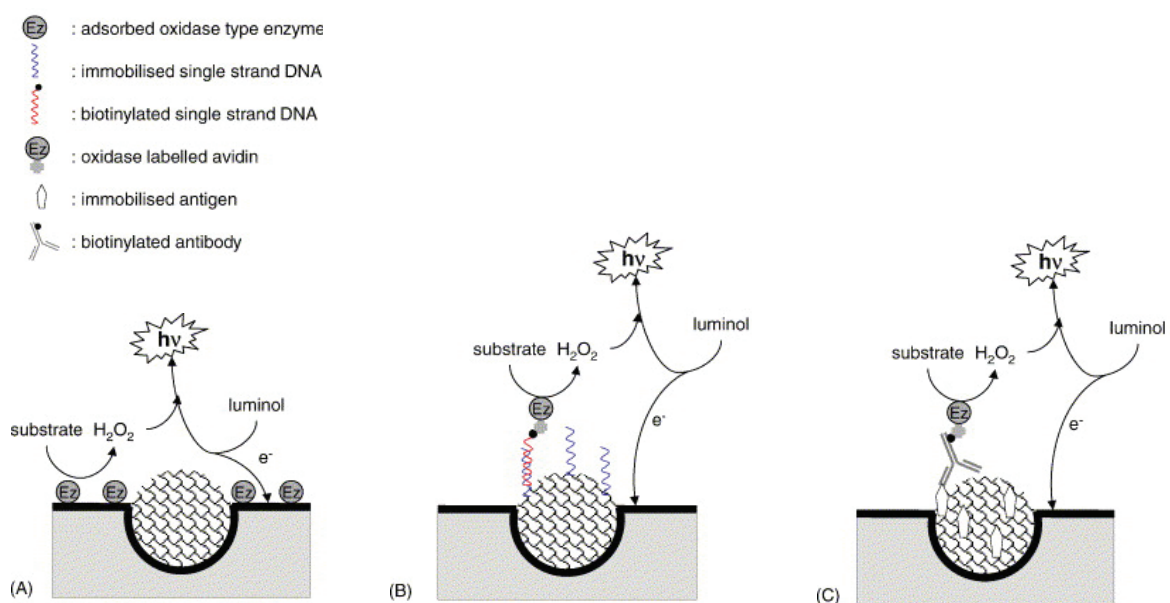


Figure 1-19. Système de détection associé à l'électrochimiluminescence du luminol

(Extrait de Marquette and Blum 2004) A. l'enzyme est colocalisée avec les billes pour la détection de différents substrats, B. l'enzyme permet le marquage d'un oligonucléotide cible, par système de reconnaissance avidine/biotine C. l'enzyme permet le marquage d'un anticorps cible, par système de reconnaissance avidine/biotine. Dans les trois cas, la détection est réalisée grâce à la catalyse enzymatique produisant du peroxyde d'hydrogène, nécessaire à l'oxydation du luminol et permettant ainsi l'émission de photons.

5.1.1.4. MARQUAGE COLORIMETRIQUE

Les puces à détection colorimétrique ont été largement développées, notamment pour répondre à une demande dans le domaine du diagnostic, pour des tests de faible coût et simple à utiliser, afin de permettre une utilisation à grande échelle. A l'origine de ces développements se trouvent les immunoessais monoparamétriques à flux latéral, comme les tests de grossesse sur bandelettes, déjà évoqués dans la partie 2.2.1 (page 37), mais aussi contrôlant la présence de certaines bactéries ou virus, tels que les tests *VIKIA-HIV-1/2* (Santos *et al.* 2011), *-Malaria Ag Pf/Pan* (Chou *et al.* 2012), ou *-HBsAG* (Bottero *et al.* 2013), commercialisés par bioMérieux, et les test *Determine -HIV-1/2* (van den Berk *et al.* 2003), *-Syphilis TP* (Diaz *et al.* 2004) ou *-HBsAG* (Franzeck *et al.* 2013) de la société Abbott. Les tests

Determine HIV-1/2 sont par exemple procurés par l'organisation mondiale de la santé (OMS – *WHO World Health Organization* www.who.int). Dans ce contexte, des tests multiparamétriques à révélation colorimétrique ont été développés pour être également appliqués au diagnostic en laboratoire d'analyse. En effet, cette méthode de détection est plébiscitée pour la simplicité de lecture des résultats, ainsi que pour le faible coût lié à l'absence d'appareillage spécifique à l'analyse des résultats. Le marquage colorimétrique peut être réalisé selon deux approches principales. La première consiste en l'utilisation de nanoparticules, et la seconde en la génération du signal par une réaction enzymatique.

NANOPARTICULES

Les nanoparticules d'or ont été très utilisées dans la fabrication de systèmes de détection. En couplant ces particules à des biomolécules, la détection et la quantification des interactions biologiques ont été effectuées grâce aux avantages des nanoparticules d'or comme marqueurs optiques. Storhoff et son équipe ont, les premiers, décrit l'utilisation des propriétés optiques des nanoparticules d'or. Ils ont utilisé ces particules pour marquer des oligonucléotides, puis en ajoutant une solution contenant les oligonucléotides complémentaires, ils ont observé le changement des propriétés optiques liées à l'agrégation des nanoparticules, avec un passage de la solution d'une couleur rouge à violette (Mirkin *et al.* 1996). Depuis, ce type de marquage a été largement utilisé, et des méthodes d'amplification du signal ont été développées.

Une amplification du signal donné par les nanoparticules d'or est souvent effectuée à l'aide d'une solution d'amplification à base de sels d'argent et d'un agent réducteur. Cette méthode est basée sur la réduction des ions argent par l'hydroquinone, produisant un précipité métallique sur les particules d'or. Sur ce principe, des nanoparticules d'or modifiées par des oligonucléotides ont été utilisées sur des puces à ADN (Taton *et al.* 2000), pour lesquelles un simple scanner de bureau a été utilisé en guise de détecteur, permettant une sensibilité similaire à une détection par fluorescence. Cette méthode a également été implémentée pour le développement de puce à protéines par Liang *et al.*, qui ont utilisé des anticorps anti-IgG biotinylés et des nanoparticules d'or fonctionnalisées par de la streptavidine (Liang *et al.* 2003). D'autres alternatives à cette méthode ont été décrites, Ma et Sui ont par exemple utilisé un mélange de HAuCl_4 et d'agents réducteurs pour augmenter la taille des particules d'or et permettre une détection plus sensible des IgG (Ma and Sui 2002).

ENZYMES

Une autre approche de marquage permettant la détection colorimétrique des interactions, réside en l'utilisation d'enzymes. Les deux enzymes les plus utilisées sont la peroxydase de raifort, déjà décrite pour son implication dans les réactions de chimiluminescence, et la phosphatase alcaline. Ces enzymes catalysent la transformation de leur substrat en un produit coloré, précipitant sur le support. La phosphatase alcaline permet la dégradation du BCIP en un intermédiaire indoxyle, qui forme un précipité violet en réagissant avec le NBT. En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase de raifort catalyse l'oxydation du TMB, formant ainsi un précipité bleu.

Ce marquage est particulièrement utilisé pour les immunotests, par un greffage de l'enzyme aux anticorps. Celui-ci peut-être réalisé sur des anticorps secondaires, c'est l'approche la plus classique et la plus simple étant donné que les anticorps secondaires permettent ensuite la reconnaissance de tous les anticorps primaires d'un type d'immunoglobuline. Cependant, un marquage des anticorps sondes est également possible. Cette méthode a par exemple été très récemment utilisée pour la détection d'acide okadaïque par Sassolas *et al.*, qui ont démontré une amélioration des performances du test en comparaison avec un marquage indirect (Sassolas *et al.* 2013). Un autre groupe a utilisé cette méthode pour la détection de deux marqueurs associés au cancer colorectal, l'antigène carcino-embryogénique (CEA) et un hydrate de carbone antigénique (CA19-9). Dans cette étude, un immunoessai en mode sandwich a été développé, avec le marquage des anticorps anti-CEA par la phosphatase alcaline, et celui des anticorps anti-CA19-9 par la peroxydase de raifort. La révélation colorimétrique effectuée par l'ajout de BCIP/NBT et de TMB a permis d'obtenir la détection des deux marqueurs, par une coloration violette pour l'un et bleue pour l'autre, comme le montre la Figure 1-20 (Wei *et al.* 2011).

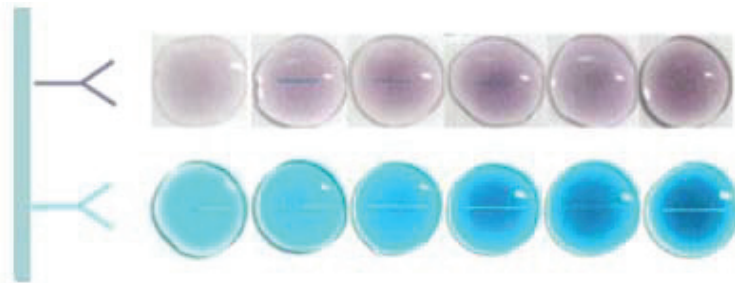


Figure 1-20. Allure du signal colorimétrique obtenu par marquage enzymatique
(Extrait de Wei *et al.* 2011) En violet sont présentés les supports de la détection par marquage avec la phosphatase alcaline, et en bleu ceux de la détection par marquage avec la peroxydase de raifort.

Le marquage peut également être effectué sur de la streptavidine, pour la détection d'interactions n'impliquant pas d'anticorps. Récemment, une méthode d'amplification du marquage colorimétrique a été décrite dans notre groupe par Le Goff *et al.*, pour la détection de polymorphisme d'un seul nucléotide. Leur approche, illustrée sur la Figure 1-21 combine l'utilisation d'un marquage par la HRP via la reconnaissance biotine/streptavidine (la biotine étant greffée à l'oligonucléotide cible), d'un substrat chromogène de l'enzyme (le TMB) et de la production in situ de peroxyde d'hydrogène, nécessaire pour la formation du précipité. Cette production est réalisée grâce à de la glucose oxydase immobilisée sur le support. Cette enzyme catalyse l'oxydation du glucose en produisant du peroxyde d'hydrogène, permettant alors l'oxydation du TMB et la génération du précipité bleu. Cette approche a conduit à une importante augmentation des performances de détection, avec des limites de détection jusqu'à 50 fois plus basses par rapport à celles obtenues avec les kits classiquement utilisés (Le Goff *et al.* 2011).

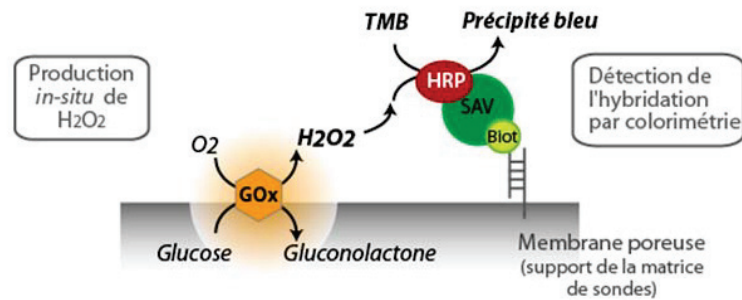


Figure 1-21. Principe de la détection colorimétrique catalysée par la HRP associée à la production locale de son substrat
(d'après Le Goff et al. 2011)

5.1.2. MARQUAGE RADIOACTIF

En marquant les molécules d'intérêt par des éléments radioactifs, il est possible de faire une détection par radiographie et de quantifier ensuite la radioactivité émise. Zhu *et al.* ont utilisé ce type de marquage pour le criblage de l'activité de kinases de *Saccharomyces cerevisiae*, à l'aide d'ATP γ - P^{33} (Zhu *et al.* 2000). Cette méthode qui est assez sensible, est cependant difficile à mettre en place pour les biopuces à protéine. En effet, l'utilisation de la radioactivité implique des contraintes qui sont difficilement gérables en vue d'une généralisation des biopuces comme outil diagnostique, dans les laboratoires d'analyse par exemple.

5.1.3. MARQUAGE MAGNETIQUE

Des particules magnétiques peuvent être utilisées pour la détection par marquage des molécules sondes. Plusieurs études ont décrit ce type de marquage pour le développement de puces, utilisant des capteurs à vanne de spin et l'effet de magnéto-résistance géante. Le phénomène de magnéto-résistance géante, décrit pour la première fois en 1988 (Baibich *et al.* 1988) et ayant fait l'objet du prix Nobel de Albert Fert et Peter Grünberg en 2007, a été à l'origine de la miniaturisation de capteurs ultra-sensibles, pour servir notamment de tête de lecture dans les disques durs, dont les structures en multi-couches de fins films opèrent selon un effet de mécanique quantique. Un changement dans le champ magnétique local induit un changement dans la résistance du capteur. Les échantillons biologiques même les plus complexes ne présentent pas de signal interférant avec les mécanismes de transduction magnétique. C'est un avantage important pour le développement de plateformes de détection basées sur l'utilisation de champ magnétique destinées à l'analyse de biomolécules dans des échantillons biologiques.

Gaster *et al.* par exemple ont décrit l'utilisation de ce type de capteur pour la détection de protéines contenues dans des échantillons biologiques, interagissant avec une matrice d'anticorps immobilisés à la surface (Gaster *et al.* 2009). La détection est réalisée par immunoessai en mode sandwich, dans lequel des anticorps non-immobilisés sont marqués par des nanoparticules super-paramagnétiques. En appliquant un champ magnétique externe, les nanoparticules sont magnétisées, et leur présence est détectée par le capteur à magnéto-résistance géante sous-jacent. Ils ont ainsi démontré la possibilité

d'application de leur capteur pour la détection multiparamétrique de marqueurs tumoraux dans des solutions à différents pH, et dans des fluides biologiques (urine, salive, sérum).

La société Magnisense (www.magnisense.com) commercialise des capteurs multiparamétriques basés sur cette approche de marquage magnétique. Ces outils ont par exemple été utilisés par Orlov *et al.* pour la détection de toxines de staphylocoque en milieu complexe (Orlov *et al.* 2013).

5.1.4. METHODES ELECTROCHIMIQUES

La détection multiparamétrique de biomolécules peut également être réalisée par mesure électrochimique. Comme pour la plupart des autres méthodes, la détection simultanée de plusieurs cibles peut être réalisée par utilisation de plusieurs marqueurs, donnant des signaux différents, et/ou par la séparation spatiale des zones de réactions, avec des zones identifiées par sonde immobilisée. En électrochimie, cette deuxième option se traduit par l'utilisation de réseaux d'électrodes, chacune étant dédiée à la mesure d'une cible en particulier. Concernant la première possibilité, différents types de marquages sont disponibles, permettant la génération d'un signal électrochimique. D'autres méthodes de détection par électrochimie sont utilisées, ne nécessitant pas de marquage. Elles seront décrites dans la partie 5.2.5 (page 73).

ENZYMES

Les molécules de marquage les plus utilisées pour ce type de détection sont des enzymes. Ce marquage, déjà décrit ici pour les méthodes colorimétriques et chimiluminescentes permet également la détection électrochimique par le biais de la mesure du produit de la catalyse enzymatique. Dill *et al.* ont par exemple utilisé 3 enzymes différentes (la laccase, la glucose déshydrogénase et la peroxydase de raifort) pour le marquage d'anticorps ou de streptavidine. Dans cette étude, la discrimination entre les différentes interactions est basée sur les différences de signal électrochimique des produits de réaction de ces enzymes (Dill *et al.* 2006). Wilson *et al.* ont eux pris le parti d'utiliser la phosphatase alcaline, catalysant l'hydrolyse de l'hydroquinone diphosphate en hydroquinone. Dans cette étude, des anticorps anti-marqueurs tumoraux ont été modifiés par l'enzyme, et l'oxydation de l'hydroquinone produite a été mesurée par ampérométrie. Dans ce cas, c'est la séparation spatiale des électrodes qui permet de différencier les marqueurs détectés, la distance entre les électrodes étant supérieure à la distance de diffusion de l'hydroquinone produite à proximité de la surface (Wilson and Nie 2006). L'utilisation d'un marquage par une enzyme peut être associée à l'utilisation de médiateurs, des agents qui facilitent le transfert électronique en participant à la réaction d'oxydoréduction. Les médiateurs sont des couples de molécules redox qui transportent les électrons du centre redox de l'enzyme vers la surface de l'électrode. Les plus utilisés sont le ferrocène et ses dérivés.

NANOPARTICULES METALLIQUES

Un marquage avec des nanoparticules ayant un signal électrochimique spécifique est parfois utilisé. Dans le cas d'un marquage multiple, pour la détection de plusieurs cibles sans contraintes de localisation, Feng *et al.* ont récemment utilisé un marquage par des nanosphères de phosphate de titane, modifiées par du

Cadmium ou par du Zinc, pour la détection de deux marqueurs de cancer, la troponine cardiaque I (cTnI) et la protéine de liaison des acides gras (FABP fatty-acid binding protein). Leur immunoessai en mode sandwich est réalisé avec les anticorps sondes immobilisées à la surface d'une électrode de carbone vitreux. Les anticorps de détection anti-cTnI et anti-FABP sont marqués par les nanosphères-Cd, et par les nanosphères-Zn, respectivement. La détection électrochimique spécifique des deux antigènes cibles est alors réalisée, par la mesure du signal des deux ions métalliques qui sont réduits à des potentiels distincts, comme le montre la Figure 1-22 (Feng *et al.* 2012). Kong *et al.* ont récemment utilisé une approche similaire avec des nanoparticules de Sulfure de Cadmium (CdS) et de Sulfure de Plomb (PbS) pour la détection de deux autres marqueurs de cancer, l'alfa-fœto protéine (AFP) et l'antigène carcino-embryogénique (CEA). Leur immunoessai de type sandwich est réalisé en solution, avec les anticorps greffés sur des billes magnétiques. Les anticorps anti-CEA sont marqués par les particules CdS, et les anticorps anti-AFP par les particules PbS. Après élimination des anticorps non fixés, les ions Cd^{2+} et/ou Pb^{2+} sont relargués et détectés électrochimiquement à des potentiels distincts (Kong *et al.* 2013).

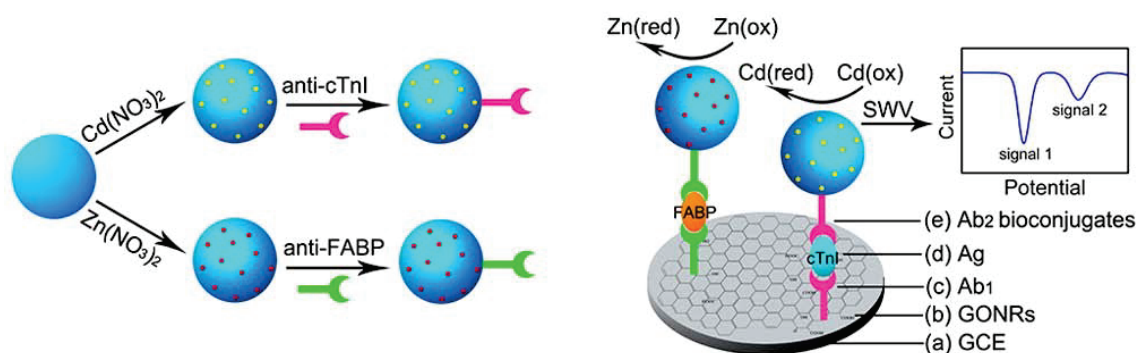


Figure 1-22. Stratégie de marquage par des nanoparticules métalliques pour la détection électrochimique d'interactions antigène/anticorps

(Extrait de Feng *et al.* 2012) Les anticorps dirigés contre deux marqueurs de cancer sont conjugués à deux types de particules métalliques permettant d'obtenir un signal spécifique associé à chacune par mesure électrochimique sur la même électrode

5.2. DETECTION SANS MARQUAGE

Les méthodes de détection sans marquage ont pour avantage de permettre des mesures dans des conditions simples d'un point de vue chimique, sans risquer de perturber par la présence de marqueurs, les interactions mises en jeu.

5.2.1. RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (SPR)

Le principe de la résonance des plasmons de surface est basé sur la génération d'un champ électromagnétique à la surface d'un conducteur métallique par un faisceau lumineux incident, de longueur d'onde et d'angle donnés. Les oscillations électroniques générées sont différentes à l'intérieur ou en surface du métal. L'angle correspondant au minimum d'intensité lumineuse réfléchi dépend de ce phénomène et par conséquent des propriétés diélectriques du milieu adjacent à cette surface. Les interactions avec des molécules immobilisées modifient ces propriétés et peuvent ainsi être étudiées. La SPR permet non seulement de détecter d'éventuelles interactions, mais aussi d'en étudier la cinétique.

L'imagerie par SPR a également été développée pour l'analyse d'interactions sur puce. Le système *Flexchip*, commercialisé par Biacore permet par exemple la détection de jusqu'à 400 interactions simultanément en une heure par imagerie SPR. Ricard-Blum *et al.* ont par exemple utilisé ce système pour l'identification des partenaires d'interaction du fragment protéolytique C-terminal du collagène XVIII, l'endostatine, afin de comprendre son mécanisme d'action au niveau moléculaire (Faye *et al.* 2009). Cette méthode de détection se prête bien à l'automatisation et plusieurs autres systèmes basés sur cette approche sont actuellement commercialisés (www.biacore.com, www.plexera.com, www.horiba.com). Plusieurs revues ont décrit différentes applications de la SPR (Kodoyianni 2011), par exemple pour l'analyse haut-débit des interactions entre biomolécules et de leur cinétique (Campbell and Kim 2007), la recherche de nouveaux médicaments par la détection d'interaction avec de petits fragments protéiques (Danielson 2009), ou encore pour le diagnostic et le suivi de la maladie l'Alzheimer par la détection de marqueurs (Liu *et al.* 2012b).

5.2.2. MICROBALANCES PIEZOELECTRIQUES

Ces systèmes de détection sans marquage permettent la mesure de masse, basée sur les variations de fréquence de résonance d'un cristal piézoélectrique. En 1959, Sauerbrey démontra que lorsqu'une tension est appliquée à un cristal de quartz par stimulation piézoélectrique, produisant son oscillation à une fréquence spécifique, le changement de masse à la surface du quartz est directement relié au changement de la fréquence d'oscillation du cristal. Ses travaux conduisirent à l'utilisation de résonateurs en plaques de quartz comme microbalance ultra-sensible, c'est de ses expériences que vient le terme de microbalance à cristal de quartz. D'après ce principe, ce système permet de détecter des variations de masse de façon très sensible. Il a alors été appliqué à la détection de biomolécules à partir de 1988, quand Lasky et Buttry décrivirent son utilisation pour la détection de glucose, par interaction avec une hexokinase immobilisée dans une matrice de polyacrylamide (Lasky Steven and Buttry Daniel 1989). Cette méthode a été plus largement appliquée à partir de la fin des années 1990, notamment à la détection de cibles oligonucléotidiques (Niikura *et al.* 1996), de bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Bovenizer *et al.* 1998) ainsi qu'à la détection et à la quantification d'anticorps en milieu biologique complexe tel que la salive (Tajima *et al.* 1998). La technologie des microbalances à cristal de quartz à contrôle de la dissipation (QCM-D) a également été commercialisée (www.q-sense.com). Celles-ci permettent de mesurer non-seulement les changements de masse mais aussi les changements de propriétés structurales.

5.2.3. MICROLEVIER ET MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM)

Le développement de systèmes basés sur des micro-leviers a commencé en 1986, avec le début de la microscopie à force atomique. Ce microscope est constitué d'une pointe métallique ou de silicium, servant de sonde locale, montée à l'extrémité d'un micro-levier flexible. Il permet de visualiser avec précision la topographie d'une surface par un balayage précis de la pointe, pour en mesurer les variations de hauteur. L'analyse des déviations subies par le micro-levier, via la mesure de la réflexion d'un laser sur celui-ci, permet de déterminer le parcours de la pointe avec ses coordonnées exactes en x, y et z, ainsi que les forces d'interactions intervenant entre elle et les éléments présents à la surface.

Cette méthode présente une limite de détection de l'ordre de 0,4 nm pour les molécules organiques. Des données sur l'orientation des protéines ou autres molécules immobilisées et capturées et sur la stœchiométrie des interactions peuvent dans certains cas être obtenues. Cette méthode est très résolutive et est présentée comme compatible pour l'analyse de surfaces matricées (Lynch *et al.* 2004). La *Virichip* commercialisée par Bioforce Nanoscience (www.bioforcenano.com) permet par exemple de détecter des pathogènes reconnus par des anticorps à la surface de la puce et d'obtenir des informations sur leur taille ainsi que sur leur forme (Nettikadan *et al.* 2004).

D'autres capteurs basés sur des systèmes de micro-leviers ont vu le jour, permettant la mesure sur plusieurs micro-leviers simultanément. Le premier avantage est la possibilité d'effectuer une mesure contrôle sur un micro-levier de référence, en même temps que la mesure sur la cible. L'autre différence majeure réside dans la conception du mécanisme. Les micro-leviers utilisés en AFM présentent automatiquement une pointe à leur extrémité, afin de balayer la surface à analyser. Les nouveaux capteurs à micro-leviers ne nécessitent pas la présence de cette pointe. La mesure est réalisée avec le micro-levier seul, selon différentes approches. La première consiste en la mesure de la déflexion statique du micro-levier, produite suite à une variation de stress de surface due à la fixation de molécules d'un côté du micro-levier (présentant des molécules sondes alors que l'autre non). Cette méthode a par exemple été utilisée pour détecter de la PSA par Datar *et al.* (Wu *et al.* 2001). Dans la seconde approche, le micro-levier est utilisé comme un outil pour évaluer les changements de stress du matériau, causés par exemple par un changement de la température dans son environnement proche. Une application pourra être par exemple la détection de molécules impliquées dans une réaction chimique induisant un changement de température. Enfin, la dernière approche est liée à la mesure des variations dans la fréquence de résonance du micro-levier, dues à un changement de masse. Cette dernière approche est probablement la plus utilisée pour la détection de biomolécules, en immobilisant par exemple des anticorps qui reconnaissent des analytes dans un flux d'échantillon.

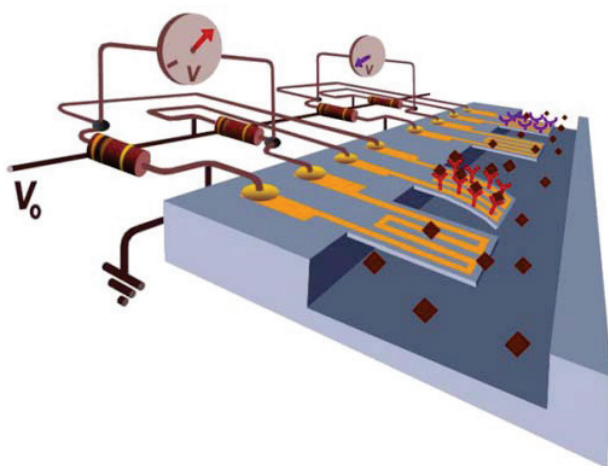


Figure 1-23. Schéma de principe de fonctionnement d'un système à microleviers en flux
(Extrait de Boisen *et al.* 2011) L'interaction de molécules sur le microlevier induit sa courbure, qui est détectée ici par un changement de résistance. La mesure est réalisée sur au moins deux leviers simultanément, l'un servant de référence.

Plusieurs revues reprennent les approches de fabrication, les modes de lecture et les applications de cette technologie (Alvarez and Lechuga 2010, Boisen *et al.* 2011, Buchapudi *et al.* 2011, Johnson and Mutharasan 2012). Différents matériaux ont été utilisés pour la fabrication de micro-leviers, le silicium classiquement, mais aussi différents polymères, intéressants pour leurs propriétés de flexibilité notamment. Plusieurs approches ont également été décrites pour la mesure de la déflexion du micro-levier, des mesures optiques déjà utilisées en AFM, des méthodes piézoélectriques, ou encore avec des lecteurs optiques intégrés telles que les guides d'ondes. Ces capteurs ont été appliqués à de nombreux domaines tels que le diagnostic, la recherche de nouveaux médicaments ou encore la détection d'explosifs. L'équipe de Boisen a par exemple développé une matrice de micro-leviers fonctionnalisés chimiquement pour la détection de 2,4-dinitrotoluène en phase liquide ou gazeuse (Bosco *et al.* 2012).

5.2.4. SPECTROMETRIE DE MASSE

La principale application sur biopuce de cette technique est l'établissement de profils d'expression protéique. La comparaison du profil protéique de deux échantillons susceptibles de présenter des différences (normaux/pathologiques, traités/non traités) permet d'identifier des cibles thérapeutiques, des marqueurs de diagnostic ou de suivi de l'efficacité d'un traitement. Les extraits biologiques sont déposés sur une barrette, les protéines contenues dans les échantillons étant retenues en fonction de la fonctionnalisation de celle-ci. Après des lavages destinés à éliminer les protéines fixées de manière non spécifique, la barrette est insérée dans un détecteur SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight) qui détermine les masses moléculaires des différentes protéines. Cette approche peut également être utilisée pour étudier des interactions moléculaires, analyser des modifications post traductionnelles et cartographier des épitopes (Yu *et al.* 2006). La société Ciphergen Biosystems commercialise ce type de puces, exploitées par exemple pour la recherche et la validation de biomarqueurs (Chapman 2002), ou encore pour la détection de marqueurs potentiels d'un infarctus cérébral (Zhang *et al.* 2008).

5.2.5. DETECTION ELECTROCHIMIQUE

La détection de molécules par méthodes électrochimiques peut nécessiter un marquage, comme il a été décrit dans la partie 5.1.4 (page 69), mais il existe aussi des méthodes sans marquage, les techniques d'impédances notamment. L'impédance électrique représente l'opposition d'un circuit au passage d'un courant alternatif sinusoïdal. C'est une généralisation de la loi d'Ohm pour les courants alternatifs. Dans le cas des puces électrochimiques, les modifications de la surface (par immobilisation de molécules par exemple) influencent donc la mesure.

Cette méthode a été utilisée pour la première fois pour la détection d'oligonucléotides dans un échantillon, grâce à leur hybridation avec des oligonucléotides sondes immobilisés à la surface de l'électrode (Souteyrand *et al.* 1997). Elle a ensuite été appliquée à la détection d'antigènes, à l'aide de la reconnaissance par des anticorps immobilisés à la surface de l'électrode par incorporation à un film de polymère de polypyrrole (Sargent and Sadik 1999). Les mesures d'impédance ont alors été plus

largement utilisées pour la détection de molécules sans marquage, comme dans l'étude menée par Marquette *et al.* pour la détection de séquences oligonucléotidiques de la protéine p53 sur un réseau d'électrodes sérigraphiées (Marquette *et al.* 2006).

Une approche originale de mesure électrochimique a été récemment décrite par Shan *et al.* Ils ont développé une méthode permettant de déterminer la densité du courant électrochimique à partir du signal optique de la surface de l'électrode généré par SPR, pour la détection de traces de TNT (Shan *et al.* 2010).

6. ANALYSE DES RESULTATS

Les analyses multiparamétriques sur biopuce permettent la génération d'une quantité importante de données qui ne sont parfois pas interprétables directement. C'est pourquoi des méthodes chimiométriques sont parfois utilisées réduisant le nombre d'informations à analyser, et les présentant sous forme graphique pour simplifier l'interprétation. Les résultats de détection sont souvent prétraités, puis ces données sont analysées selon différentes techniques d'analyses à plusieurs variables. La figure 1 illustre la catégorisation de ces méthodes d'analyse (Jurs *et al.* 2000). Elles sont séparées en 3 groupes principaux (statistique, cluster ou réseaux neuronaux artificiels), puis en fonction de leur utilisation pour la classification ou pour la quantification, et enfin les méthodes nécessitant un regroupement par classes sont séparées des autres (Figure 1-24). Les principales méthodes utilisées sont décrites ci-après.

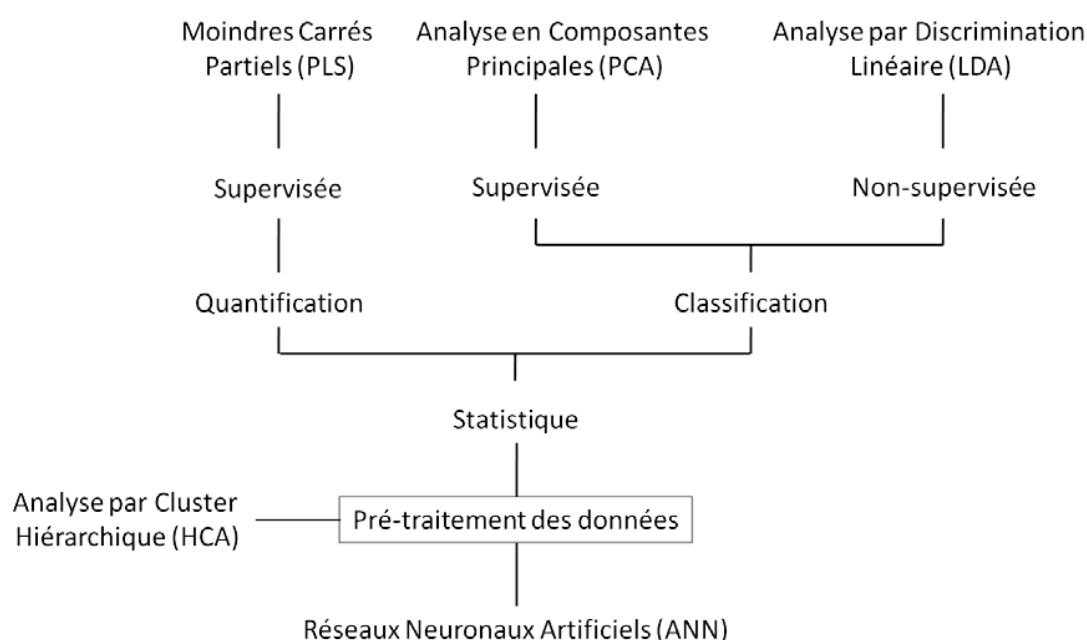


Figure 1-24. Diagramme des méthodes chimiométriques utilisées pour l'analyse des données de biopuces

6.1. PRE-TRAITEMENT DES DONNEES

Dans certains cas, les résultats générés par les différentes méthodes de détection peuvent être utilisés tels quels pour l'analyse chimiométrique. La plupart du temps cependant, une étape de traitement des résultats est requise. Cette étape peut affecter de façon importante l'analyse qui suivra, c'est pourquoi il est très important de choisir le traitement adapté aux données. Les différentes méthodes permettent d'obtenir différents types d'informations lors de l'analyse chimiométrique, elles peuvent être utilisées pour lisser les résultats ou pour s'affranchir de certaines variations, dans le but d'obtenir la meilleure résolution possible. Les résultats de l'analyse chimiométrique effectuée avec des données pré-traitées devront systématiquement être comparés avec celle effectuée avec des données brutes, de même pour

les données traitées selon différentes méthodes, afin de vérifier que le traitement serve à l'analyse, et ne favorise pas de perte d'information importante (Anzenbacher *et al.* 2010).

Différentes méthodes de pré-traitement ont été utilisées, incluant la mise à l'échelle relative, la soustraction du bruit de fond, la moyenne du signal, la linéarisation, le centrage autour de la moyenne, la mise à l'échelle automatique ou selon des paliers. Les méthodes de normalisation sont généralement utilisées pour des résultats qualitatifs, car certaines sont responsables de la perte de la relation de dépendance entre le signal et la concentration d'un composé. Ces méthodes mettent également en jeu la moyenne des réplicats, et le calcul de la déviation standard entre ceux-ci, pour calculer les limites de quantification par exemple. Les méthodes de linéarisation sont utiles par exemple pour déterminer la gamme pour laquelle le signal est dépendant de la concentration lors de mesures donnant des réponses non-linéaires. D'autre part, certaines méthodes de mesure connaissent des variations intrinsèques, dues à une variation de la surface du détecteur par exemple. Un traitement sera donc utilisé pour focaliser l'analyse sur les variations dues à la cible détectée, en s'affranchissant de la variation intrinsèque au capteur.

Les différentes méthodes de pré-traitement ne seront pas décrites ici, les plus classiques uniquement, déjà citées ci-dessus, étant utilisées dans cette thèse. Suite au pré-traitement des données, différentes méthodes d'analyse peuvent être appliquées. Les plus utilisées pour les biopuces sont décrites brièvement ci-dessous.

6.2. METHODES D'ANALYSE

6.2.1. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (PCA)

La méthode de PCA est un traitement statistique consistant en la réinterprétation d'un groupe de données multidimensionnelles en un nouveau groupe de dimensionnalité réduite de façon à ce que les caractéristiques les plus significatives soient conservées. La réduction du nombre de données est effectuée par décomposition en vecteurs propres et valeurs associées, qui correspondent aux composantes principales. L'importance de ces valeurs représente la variance des données et peut être affichée graphiquement sur des axes de composantes principales. Cette analyse permet de mettre en avant la possibilité de classification des résultats donnés par la matrice sous la forme de nuages de points, impliquant alors la possibilité de discriminer les analytes correspondant. En entrant comme données de base les valeurs de différentes sources de résultats, la contribution de chacune de ces sources peut être représentée sur les différents axes PC, et l'importance de ces sources peut ainsi être évaluée. C'est l'une des méthodes les plus utilisées. Wright et Anslyn ont par exemple passé en revue les performances de différents capteurs permettant la reconnaissance de molécules de différents types (nucléotides, protéines, peptides, composés organiques, ions métalliques etc), évalués à l'aide de cette méthode (Wright and Anslyn 2006). Récemment, l'équipe de Palucci a par exemple utilisé cette méthode pour l'interprétation de résultats de spectres de SERS, difficiles à interpréter de façon visuelle, pour la détection de différents explosifs (Botti *et al.* 2013). Cet exemple est illustré sur la Figure 1-25.

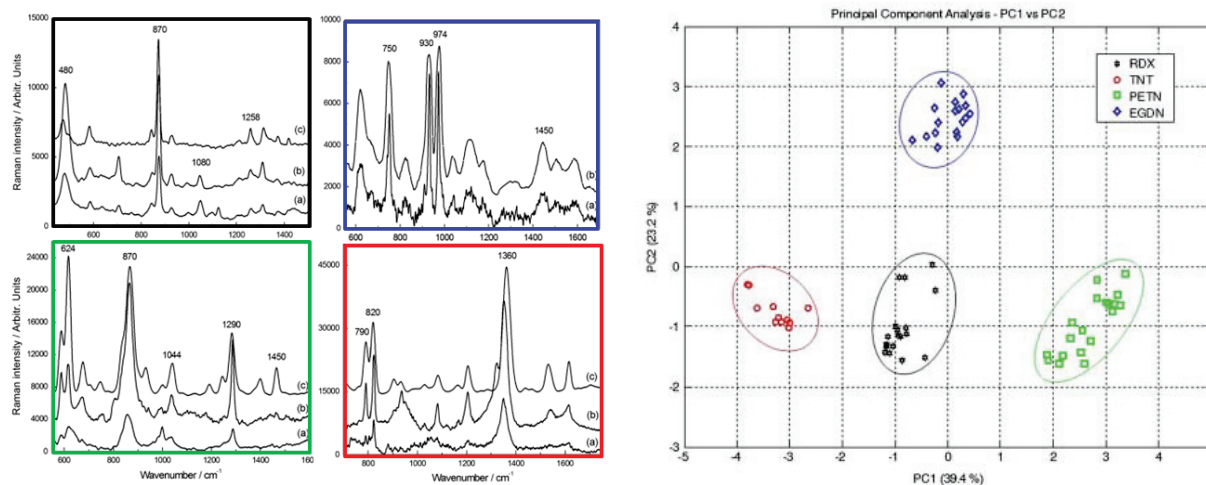


Figure 1-25. Spectres obtenus par SERS et leur représentation graphique après analyse en composantes principales
(Extrait de Botti *et al.* 2013) Encadrés en noir sont représentés les spectres de RDX (à gauche de la figure) et les résultats PCA associés (sur le graphique de droite), en bleu ceux de EGDN, en vert ceux de PETN et en rouge ceux de TNT.

La méthode de régression en composantes principales peut ensuite être utilisée, à partir des résultats de PCA. Cette méthode est basée sur l'idée que les composantes principales obtenues par PCA sont des variables qui peuvent intervenir dans une régression multiple. Cette approche est un outil intéressant pour l'analyse multiparamétrique, elle est cependant moins utilisée, au profit de la méthode des moindres carrés partiel (PLS, Partial Least Squares) (Keithley *et al.* 2009).

La méthode des moindres carrés partiels permet d'obtenir des informations assez similaires à celles obtenues par PCA, en utilisant plus d'informations. Elle a été utilisée pour séparer et quantifier des analytes d'intérêt, à partir des données extraites de la réponse de différents capteurs. Jurs *et al.* en ont présenté plusieurs exemples (Jurs *et al.* 2000).

6.2.2. ANALYSE PAR DISCRIMINATION LINEAIRE (LDA)

Ce type d'analyse est utilisé également pour classer des résultats, et pour déterminer l'appartenance d'un analyte à une classe particulière. Dans ce cas, les données entrées sont les résultats par classe d'analyte. Des fonctions discriminantes sont calculées dans le but de maximiser la séparation entre les classes et de minimiser les différences au sein de la même classe. Dès lors que les classes sont connues, un analyte peut être assigné à une classe en particulier, lorsque les résultats obtenus pour cet analyte sont proches de ceux obtenus pour l'ensemble des analytes de la classe définie. Cette approche a par exemple été utilisée pour distinguer différentes lignées de cellules cancéreuses, ou pour distinguer des cellules normales de cellules cancéreuses ou métastatiques à l'aide de la mesure par fluorescence de leurs interactions avec 3 types de nanoparticules fonctionnalisées, comme l'illustre la Figure 1-26 (Bajaj *et al.* 2009).

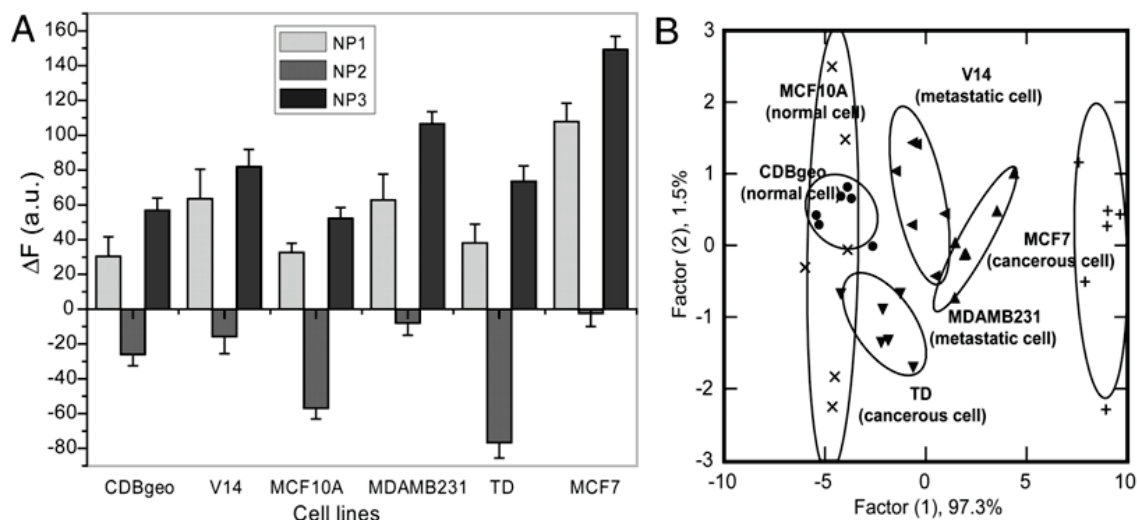


Figure 1-26. Diagramme de résultats obtenus par mesure de fluorescence et leur représentation graphique après analyse par discrimination linéaire

(Extrait de Bajaj et al. 2009) A. diagramme de la variation de fluorescence observée pour différentes lignées cellulaires avec trois types de nanoparticules, B. représentation graphique des résultats de LDA associés.

6.2.3. ANALYSE PAR CLUSTER HIERARCHIQUE (HCA)

L'analyse par cluster hiérarchique est une méthode qualitative, basée sur la différence de la forme de réponse donnée par chaque analyte et groupe d'analytes, qui permet de grouper les analytes de façon hiérarchique. Elle utilise un paramètre calculé sur la base de la distance entre deux points dans différentes dimensions correspondant au nombre de réponses du capteur, ce paramètre est appelé distance métrique euclidienne. Cette méthode produit un résultat sous forme de dendrogramme qui met en avant les différences ou similarité entre les observations selon un mode unidimensionnel. Lim *et al.* ont par exemple utilisé cette méthode appliquée à l'analyse des résultats issus de la détection multiparamétrique à révélation colorimétrique d'analytes volatils, et en particulier de 19 produits chimiques industriels toxiques. Les résultats obtenus dans cette étude (détection colorimétrique et HCA appliqué aux résultats) sont illustrés dans la Figure 1-27, présentant la classification des composés grâce à cette méthode (Lim *et al.* 2009). Cette approche est cependant peu efficace pour les données présentant un bruit de fond important ou peu de similarités.

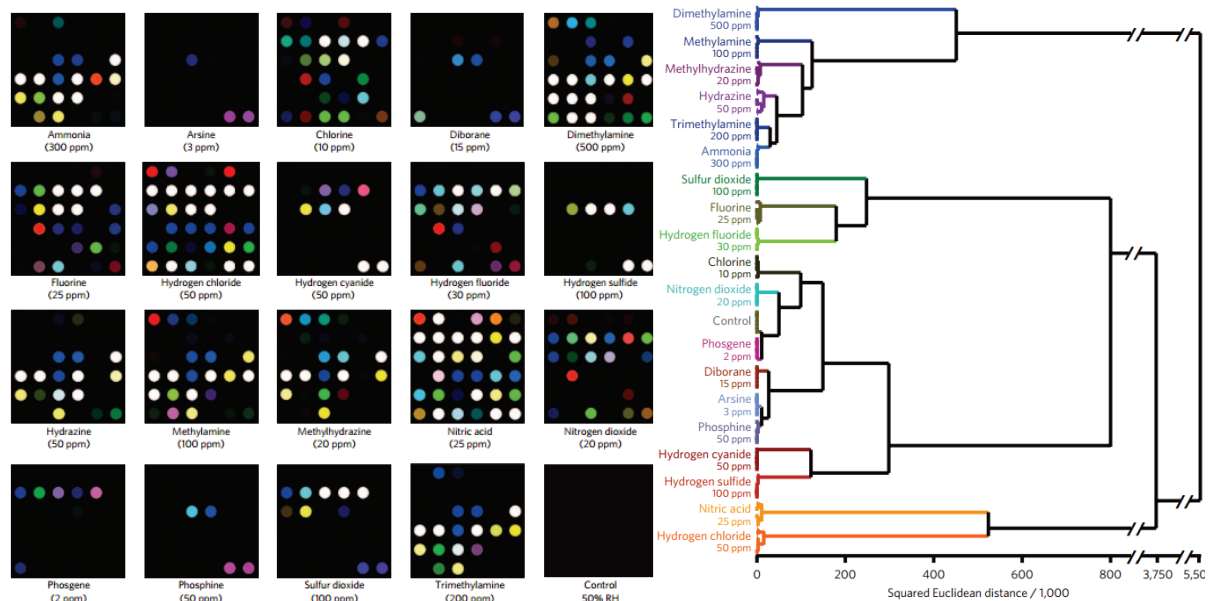


Figure 1-27. Image de résultats obtenus après détection colorimétrique et leur représentation graphique après analyse par cluster hiérarchique.

(Extrait de Lim et al. 2009) Les images correspondent à la détection de 19 composés et d'un contrôle (une image par composé, à gauche de la figure), et leur classification par HCA est représentée sous forme d'un dendrogramme (graphique de droite)

6.2.4. RESEAUX NEURONAUX ARTIFICIELS (ANN)

Les réseaux neuronaux artificiels sont des modèles adaptatifs qui permettent d'établir toutes les relations possibles entre des données. Ils sont conçus comme des boîtes noires utilisées pour cartographier les relations entre vecteurs entrants et sortants. Ils sont basés sur un système multi-couches, constitué de différentes unités et de différentes connexions. Chaque unité doit être activée, et chaque lien entre unité a un poids précis. Les unités sont organisées en couches. Il y a trois types d'unités distinctes : une couche des données acquises par le capteur (les données d'entrée), une couche des données de sortie (les analytes par exemple), et une couche d'unités cachées. L'idée de base est que l'information passe par un chemin et arrive à une synapse, une analogie avec les axones neuronaux. Une fois arrivée à la synapse, l'information est transformée et envoyée au neurone suivant. Ce transfert d'information est stimulé par un signal entrant, modifié par le poids synaptique, pour arriver en un signal sortant. Les couches cachées sont déterminées par l'utilisateur et ajustées en fonction du système. Le processus ajuste le poids des couches pour maximiser le nombre de données de sortie désirées en fonction des données d'entrée, en minimisant les divergences entre les données de sorties du réseau et des valeurs attendues pour un groupe de données connues. Le système permet alors la détermination d'un analyte à partir des données d'entrée de cet analyte (Anzenbacher *et al.* 2010). Riul *et al.* ont par exemple utilisé cette méthode pour identifier des échantillons de différents vins à l'aide d'un capteur gustatif électronique (*electronic tongue*), dont certains plus vieux et stockés dans différentes conditions ne pouvaient être identifiés par PCA (Riul Jr *et al.* 2004).

Chapitre 2. Marqueurs biologiques et diagnostic

1. ETAT PATHOLOGIQUE ET DIAGNOSTIC

1.1. LES ALLERGIES

1.1.1. GENERALITES

L'allergie est définie comme étant une réaction anormale et spécifique de l'organisme au contact d'une substance étrangère (allergène) qui n'entraîne pas de trouble chez la plupart des sujets. Elle correspond à un dysfonctionnement du système immunitaire qui entraîne une hypersensibilité contre ces substances allergènes. L'allergie immédiate la plus courante correspond à une hypersensibilité de type I, dite IgE-spécifique. L'Organisation Mondiale de la Santé a classé l'allergie comme le 4^{ème} problème de santé publique mondial, après le cancer, les maladies cardio-vasculaires et le SIDA, et estime que d'ici 2020, elle s'étendra à 50 % de la population mondiale. Elle touche aujourd'hui environ 30 % de la population des pays développés.

Les allergies peuvent se manifester sous différents symptômes, touchant différentes parties de l'organisme telles que le nez, les sinus, les yeux, l'appareil respiratoire, la peau, ou encore le système digestif. Les symptômes les plus rencontrés sont la rhinite, la sinusite, l'asthme, la conjonctivite et la dermatose atypique. Les allergies sont dues à différents types d'allergènes. Les plus répandus sont les allergènes présents dans l'air tels que les pollens. On trouve également les moisissures, poussières et acariens. Les aliments sont également une source importante d'allergènes, les plus courants étant le blé, le lait, les fruits à coques, les œufs, le soja, les arachides ou encore les crustacés, mais la liste des allergènes alimentaires est très longue et peut concerner la quasi-totalité des aliments. D'autres substances telles que des médicaments (aspirine), antibiotiques (pénicilline), venins d'insectes, poils et salive d'animaux ou matériaux (latex) conduisent à des réactions allergiques chez les sujets sensibles.

1.1.2. SENSIBILISATION ET REACTION ALLERGIQUE

Le mécanisme de l'allergie se déroule en deux phases, comme l'illustre la Figure 2-1. Lors de la première, l'organisme en contact avec l'allergène le reconnaît et construit un système de défense, c'est la sensibilisation. La seconde phase résulte d'un contact de l'organisme sensibilisé avec l'allergène, c'est la réaction allergique à proprement parler.

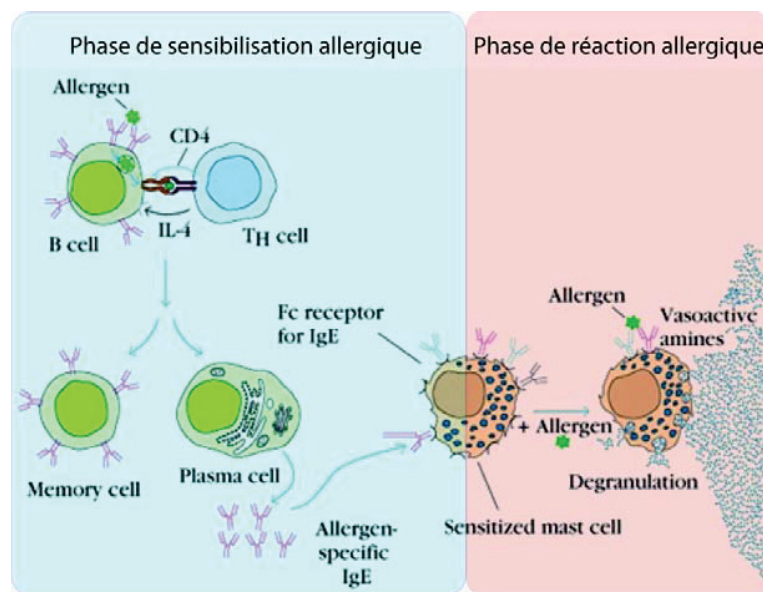


Figure 2-1. Mécanisme de l'allergie.
(Extrait de Janis Kuby, Immunologie)

Lors de la sensibilisation, les allergènes entrant dans l'organisme activent les lymphocytes B, qui reçoivent un signal d'aide après reconnaissance d'un lymphocyte T conduisant, aidé par l'IL4 à la production d'anticorps, et notamment d'IgE spécifiques de ces allergènes.

Lors d'une seconde exposition, la formation de complexes immuns avec les allergènes à la surface des mastocytes entraîne une cascade de réaction qui conduit à la dégranulation. Les granules contiennent des médiateurs pro-inflammatoires, notamment des molécules d'histamine (10% du contenu), en grande partie responsables des symptômes allergiques, mais aussi leucotriènes et prostaglandines (Segal *et al.* 1977).

Les IgE, classe d'immunoglobulines la moins représentée dans les fluides biologiques, ont été découverts en 1966 par Ishizaka *et al.*, et identifiés comme les molécules clés de la réaction allergique. Ce processus est mis en œuvre dans les allergies IgE dépendantes, dites allergies immédiates, ou hypersensibilité de type I, qui sont les plus répandues. Les hypersensibilités de type II, III et IV de la classification de Gell et Coombs, n'impliquant pas les IgE ne seront pas traitées ici.

1.1.3. TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DE DIAGNOSTIC DES ALLERGIES

En cas d'allergie suspectée, la première méthode de diagnostic réalisée consiste en un test cutané. Il en existe trois types. Les *prick test*, décrits pour la première fois par Lewis et Grant en 1924, sont les plus pratiqués. Ils sont basés sur le dépôt de très faibles doses de plusieurs extraits d'allergènes sur la peau (sur l'avant-bras généralement), amenés à pénétrer dans les couches superficielles à l'aide d'une lancette (instrument chirurgical de ponction). L'apparition d'un gonflement et d'une rougeur à l'endroit de la piqûre, s'accompagnant de démangeaisons témoigne alors de la réaction positive à l'allergène injecté. Les tests intradermiques consistent à réaliser une injection dans le derme. Ils nécessitent une

concentration d'allergène plus faible que les *prick tests* pour une meilleure sensibilité, du fait du volume plus important qui est directement injecté. Ils sont maintenant réservés au diagnostic des allergies aux venins ou aux médicaments. Enfin, les tests sous forme de patch consistent à plaquer des substances sur le dos et à vérifier si des réactions locales sont apparues et permettent de rechercher une allergie de contact ou médicamenteuse. Des tests sous forme de patch sont par exemple commercialisés pour détecter l'allergie au lait de vache, notamment chez les nourrissons (DBV Diallertest).

La seconde méthode de diagnostic, utilisée si les résultats des tests cutanés sont discordants par rapport aux manifestations cliniques observées, consiste en un dosage des IgE totales ou des IgE spécifiques d'un allergène. Le tout premier test *in vitro* de ce type a été mis au point en 1966 pour le dosage des IgE totales, à l'aide d'anticorps anti-IgE immobilisés sur des supports de sépharose (Wide and Porath 1966). Puis, en 1967 un test basé sur la technique RAST (RadioAllergoSorbent Assay) a permis le dosage des IgE spécifiques (Wide *et al.* 1967). Ce test est effectué en suspension avec des billes de sépharose modifiées par différents allergènes, qui sont incubées avec le sérum du patient. Les IgE présents dans le sérum interagissent avec les allergènes correspondant et l'interaction est détectée par l'utilisation d'anticorps anti-IgE radio-marqués. Ce système a depuis été amélioré et est commercialisé par Phadia, ce sont les systèmes CAP, existant pour les IgE totales et pour les IgE spécifiques comme l'illustre la Figure 2-2. La compagnie Theradiag commercialise également ses tests de dosage multiparamétrique des IgE spécifiques, permettant de détecter la sensibilité à un panel de 30 allergènes (CLA Optigen 30). Ces tests et les performances apportées seront décrits plus en détail ci-après.

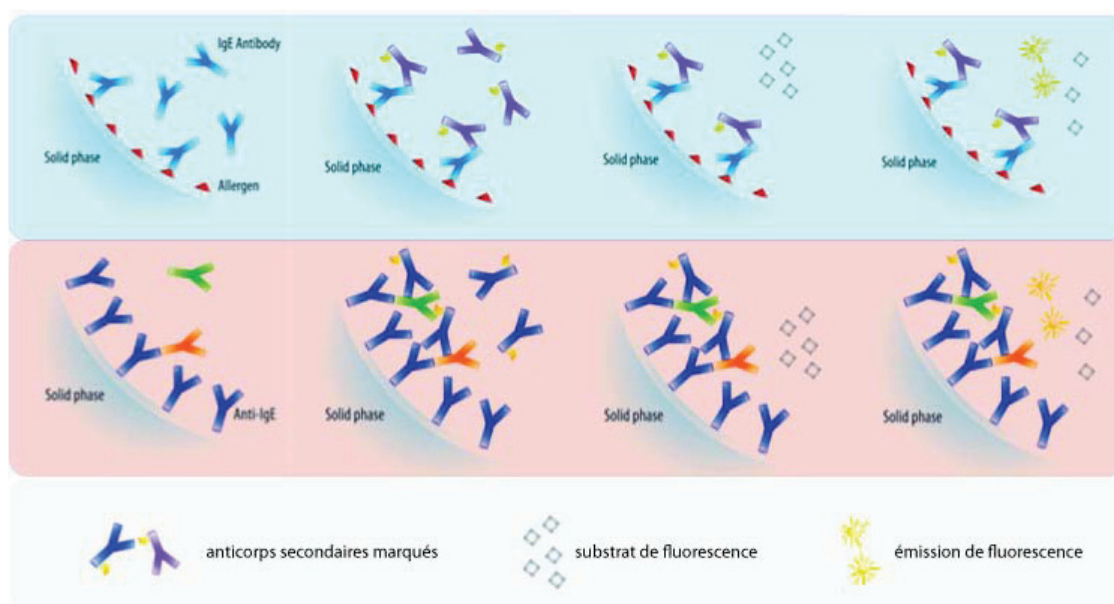


Figure 2-2. Principe des tests "CAP", commercialisés par Phadia

(Source : www.phadia.com) Les images de la ligne supérieure correspondent à un test de dosage d'IgE spécifiques, et celle du dessous à un test de dosage des IgE totales.

La dernière méthode, utilisée pour les allergies alimentaires, est le test de provocation par voie orale (TPO) ou *Oral Food Challenge* (Järvinen and Sicherer 2012). Il permet de différencier une sensibilisation (qui pourrait donner un test *prick* ou de dosage d'IgE positif, mais sans pertinence clinique) d'une allergie alimentaire. Le TPO consiste en l'administration par voie orale de l'aliment suspecté, à doses croissantes toutes les 20 minutes jusqu'à l'apparition d'une réponse symptomatique. Il permet de définir la quantité d'aliment qui provoque l'apparition de symptômes, et le type de signes cliniques déclenchés. Ces informations permettent d'évaluer les risques lors de consommation accidentelle, et guident les mesures à prendre. Ce test étant potentiellement dangereux (survenue de réactions importantes), il doit toujours être réalisé sous surveillance médicale, en milieu hospitalier.

1.2. LE CANCER

1.2.1. GENERALITES

Le terme de « cancer » définit un groupe de pathologie pouvant toucher différentes parties de l'organisme, par le développement de tumeurs malignes. Il est caractérisé par une prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent former des métastases et envahir des parties adjacentes de l'organisme. Cette pathologie est une des premières causes de décès dans le monde, à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit près de 13 % de la mortalité mondiale. D'après les projections de l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer, elle va continuer à augmenter, pour dépasser 13,1 millions de décès en 2030.

Le cancer apparaît à partir d'une seule cellule. La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est un processus passant par plusieurs étapes. Il y a classiquement une évolution vers une lésion précancéreuse puis vers une tumeur maligne. Ces modifications proviennent des interactions entre les facteurs génétiques propres au sujet et des agents extérieurs : les cancérogènes physiques, rayonnement ultraviolet par exemple, les cancérogènes chimiques, pouvant contaminer l'eau, les aliments ou l'environnement (amiante, composants de la fumée du tabac, toxines...) et les cancérogènes biologiques, comme des infections dues à certains virus, bactéries ou parasites. Les principaux facteurs de risque comportementaux (tabagisme, consommation d'alcool, surpoids, manque d'activité physique, mauvaise alimentation, exposition solaire excessive) seraient responsables d'environ 30% des décès par cancer, le tabagisme entraînant à lui seul 22% de la mortalité par cancer et 71% des décès par cancer du poumon. Le vieillissement est un autre facteur naturel mais fondamental dans l'apparition du cancer.

1.2.2. LA TUMORIGENESE

La pathologie cancéreuse est caractérisée par la prolifération de cellules anormales. Une néoplasie, aussi appelée tumeur, est une masse anormale de tissu dont la croissance est excessive, non coordonnée avec celle du tissu normal, et qui persiste après la cessation des stimuli qui l'ont induite. Elle débute par des changements génétiques qui induisent une prolifération cellulaire excessive, échappant aux régulations normalement en place : les cellules néoplasiques continuent à se diviser sans l'influence des signaux régulateurs de croissance. Ce type de tissu adhère à n'importe quel support, envahit et détruit les

structures adjacentes et colonise des sites distants par la formation de métastases. Les tumeurs sont constituées du parenchyme, formé des cellules néoplasiques, et du tissu de soutien, le stroma, formé du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et des cellules inflammatoires dérivées de l'hôte, qui permet la croissance de la tumeur.

Un néoplasme est la conséquence d'anomalies successives qui perturbent de façon permanente la prolifération cellulaire. Si une cellule saine acquiert une mutation oncogénique, une réponse anti-proliférative est normalement mise en place. En l'absence de cette réponse, la mutation produit une lésion, un phénomène d'apoptose ou de sénescence doit alors avoir lieu. Si cette étape est aussi défailante, la croissance se poursuit et génère une accumulation des mutations, c'est à ce stade qu'on parle de tumeur maligne.

Le dysfonctionnement du cycle cellulaire, conduisant au développement tumoral a été associé à l'altération de trois types de gènes : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de maintien de l'intégrité. Les oncogènes correspondent à la forme altérée de gènes normaux, les proto-oncogènes responsables de la prolifération cellulaire. Ils peuvent induire l'apparition et le développement d'une tumeur. Sont compris dans cette catégorie les gènes immortalisants (type myc) codant pour des protéines nucléaires se liant à l'ADN, et les gènes transformants (ras par exemple). Les gènes suppresseurs de tumeur, ou anti-oncogènes, sont des inhibiteurs de la croissance cellulaire. L'inactivation des protéines codées par ces gènes résulte en l'absence d'un signal de non-prolifération cellulaire. Le gène codant pour la protéine p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus souvent impliqué, et présentant des mutations dans la majorité des cancers. Les oncogènes et suppresseurs de tumeur codent pour des protéines jouant un rôle dans les mécanismes cellulaires tels que la signalisation, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase par exemple, tels que EGFR ou Her2/neu). Le dernier type concerne les gènes de maintien de l'intégrité (*care takers*). Ils codent pour des protéines prenant part à un complexe de surveillance de l'intégrité du génome, qui détectent les lésions de l'ADN et mettent en place des mécanismes de réparation. L'altération de ces gènes conduit à une susceptibilité importante aux cancers (Hanahan and Weinberg 2000).

De plus, le développement de la tumeur implique une activation de l'angiogenèse, permettant l'alimentation des tissus tumoraux via les vaisseaux sanguins. A la périphérie des tumeurs la croissance des cellules endothéliales est largement accélérée pour favoriser la formation de nouveaux vaisseaux. La prolifération des cellules endothéliales est 50 à 200 fois plus élevée que dans les tissus normaux, et les vaisseaux formés sont anormaux. On trouve alors des taux élevés de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par exemple, dont la production est contrôlée par des cascades de réaction impliquant différentes protéines telles que les MAPKines ou les Ras et Raf. La matrice extra-cellulaire (MEC) connaît également des modifications anormales, notamment des processus de dégradation par des métalloprotéases matricielles qui permettent la progression des cellules tumorales et qui génèrent des fragments de protéines de la MEC identifiés comme des modulateurs de l'angiogenèse au sein des tumeurs. Au centre de la tumeur, néo-vascularisation et vascularisation d'origine de l'hôte sont mêlées, la densité de circulation est plus faible, ce qui conduit les cellules tumorales à une adaptation à l'hypoxie en activant la glycolyse anaérobie. Les cellules endothéliales activent la production de molécules du

stress hypoxique tel que le VEGF et son récepteur, l'EPO, ou encore des inhibiteurs de l'apoptose tels que bcl-2. Les cellules tumorales peuvent alors aisément accéder au compartiment intra-vasculaire et coloniser l'organisme par la formation de métastases.

1.2.3. BIOMARQUEURS DE CANCER

La mutation de proto-oncogènes en oncogènes, ou l'altération de gènes suppresseurs de tumeurs peut conduire à la production anormale de protéines, caractérisées alors comme des antigènes associés aux tumeurs (TAA : *Tumor-Associated Antigen*). La cellule tumorale accumule des mutations sur ce type de gène mais également sur d'autres gènes qui ne sont pas forcément associés au processus de tumorigenèse. De plus, le tissu de soutien de la tumeur, constitué du tissu conjonctif, des vaisseaux sanguins et des cellules inflammatoires, permettant la croissance de la tumeur, est également affecté par des modifications dues à la présence des cellules tumorales. Le processus d'angiogenèse est régulé par un grand nombre de protéines, modifie la quantité de protéines présente mais aussi induit la modification de certaines, comme dans la matrice extracellulaire par exemple. Ainsi, le développement tumoral à tous les niveaux influe sur la production de protéines, qui sont alors présentes de façon anormalement concentrée, ou modifiées. Certaines connaissent des modifications post-traductionnelles par exemple n'étant pas effectuées en conditions normales.

Ces différentes modifications génèrent une réaction du système immunitaire, qui ne reconnaît plus ces éléments comme du « soi », induisant ainsi la perte de la tolérance immunitaire et la production d'auto-anticorps dirigés contre ces antigènes associés aux tumeurs. Le procédé par lequel les protéines intracellulaires deviennent des cibles des auto-anticorps n'est pas encore clairement connu, mais il a été suggéré que les modifications post-traductionnelles associées à une mort cellulaire anormale pourraient augmenter leur immunogénicité. Une autre possibilité pour certaines protéines réside dans le fait que des protéines fœtales sont exprimées dans les cellules tumorales, ou exprimées en quantité anormalement élevée dans les tissus affectés, induisant ainsi la perte de la tolérance immunitaire pour ces antigènes. La plupart des antigènes associés aux tumeurs sont des protéines cellulaires dont la fonction ou la régulation aberrante peut être liée à la malignité. La nature oncogène de la plupart des TAA a conduit à l'hypothèse que les auto-anticorps associés au cancer sont des « rapporteurs » ou des « sentinelles » de l'immunité, identifiant les mécanismes cellulaires aberrants associés à la tumorigenèse (Casiano *et al.* 2006). Les TAAs, tout comme les auto-anticorps dirigés contre ces antigènes sont alors considérés comme des biomarqueurs de cancer. Un très grand nombre de molécules a déjà été décrit comme étant des biomarqueurs, même si très peu sont aujourd'hui utilisés cliniquement, quelques exemples sont présentés dans le Tableau 2-1 ci-après.

Tableau 2-1. Exemples de biomarqueurs décrits dans la littérature

Biomarqueur(s)	Type(s) de cancer	Référence(s)	Référence(s) (panels d'antigènes)
Antigène de cancer CA19-9	Sein	(Lopez <i>et al.</i> 1999)	
Annexine XI-A	Sein	(Fernandez-Madrid <i>et al.</i> 2004)	
Antigène Carcino-embryogénique - CEA	Colorectal	(Carpelanholmstrom <i>et al.</i> 1995)	
Protéine d'interaction avec la hungtintine 1 - HIP-1	Prostate	(Bradley <i>et al.</i> 2005)	(Kijanka and Murphy 2009)
Protéine kinase A c-AMP dépendante	Plusieurs	(Nesterova <i>et al.</i> 2006)	
Suppresseur de tumeur p53	Plusieurs	(Soussi 2000)	
Antigène de cancer CA 15-3	Sein	(Safi <i>et al.</i> 1991)	
Récepteur à l'oestrogène	Sein	(Osborne <i>et al.</i> 1980)	(Yin <i>et al.</i> 2010)
Récepteur à la progestérone	Sein	(Horton 2001)	
Her-2/neu	Ovaire	(Canney <i>et al.</i> 1984)	
Antigène de cancer CA-125	Foie	(Chen and Sung 1977)	
Alpha-foetoprotéine - AFP	Testicules	(Jacobsen and Jacobsen 1983)	
Gonadotrophine chorionique humaine - hCG	Prostate	(Lilja <i>et al.</i> 2008)	
Antigène spécifique de la prostate - PSA	Plusieurs	(Benchimol <i>et al.</i> 1989)	
Antigène Carcinoembryogénique - CEA	Ovaires Colon	(Angelopoulou and Diamandis 1997, Sandler <i>et al.</i> 1998)	(Gunawardana and Diamandis 2007)
p53	Poumon	(Tureci <i>et al.</i> 2006)	
NY-ESO-1	Sein	(vonMensdorffPouilly <i>et al.</i> 1996)	
MUC-1	Mélanome	(Fishman <i>et al.</i> 1997)	
Tyrosinase	Sein	(Doyle <i>et al.</i> 2000)	(Zhang <i>et al.</i> 2003)
c-myc	Plusieurs	(Ambrosini <i>et al.</i> 1997, Rohayem <i>et al.</i> 2000)	
Survivine	Plusieurs	(Crawford <i>et al.</i> 1982, Winter <i>et al.</i> 1992, Lubin <i>et al.</i> 1995, Ralhan <i>et al.</i> 1998, Rohayem <i>et al.</i> 2000, Tan 2001)	
p53	Plusieurs	(Zhang <i>et al.</i> 1999, Lu <i>et al.</i> 2001)	
p62	Plusieurs	(Zhang <i>et al.</i> 2001)	
Her2/neu	Plusieurs	(Cheever <i>et al.</i> 1995, Disis <i>et al.</i> 1997)	
Cycline B1	Plusieurs	(Covini <i>et al.</i> 1997) (Kao <i>et al.</i> 2001)	
Koc	Plusieurs	(Zhang <i>et al.</i> 2001)	
IMP1	Plusieurs	(Nielsen <i>et al.</i> 1999)	
p21 ras	Plusieurs	(Cheever <i>et al.</i> 1995)	
Bcr-abl	Plusieurs	(Cheever <i>et al.</i> 1995)	
Racémase alpha-Methylacyl-CoA	Prostate	(Sreekumar <i>et al.</i> 2004)	
Phosphoglycerate kinase-1, histone H4	Pancréas	(Patwa <i>et al.</i> 2009)	
Culline 4B	Colorectal	(Jiang <i>et al.</i> 2013)	
Protéine homéoboite A13	Estomac	(Han <i>et al.</i> 2013)	
Substrat de la kinase cycline-dépendante et de la caséine kinase du noyau	Colorectal	(Kikuchi <i>et al.</i> 2013)	
Transporteur de la Monocarboxylate 2 - MCT2	Prostate	(Pértega-Gomes <i>et al.</i> 2013)	
Pyruvate Kinase M2	Vésicule biliaire	(Dhar <i>et al.</i> 2013)	
Facteur de transcription Pax8	Ovaire	(Bowen <i>et al.</i> 2007)	
Protéine induite par l'acide rétinolique 3 - RA13	Colon	(Zougman <i>et al.</i> 2013)	
Protéine du complexe synaptonémal 3	Plusieurs	(Chung <i>et al.</i> 2013)	
Visfatine	Endomètre	(Tian <i>et al.</i> 2013)	

HER2, p53, Endostatine, Lipophiline B, HSP90, Cycline B1, Fibuline, Cycline D1, Cathepsine D, TOPO2alpha	Sein		(Lu <i>et al.</i> 2008)
Mammaglobine, Survivine, Livine, NY-ESO-1, Annexine XI-A, Endostatine, Hsp60, p62	Sein	(Duffy 2006) (Molina <i>et al.</i> 2005)	(Yang <i>et al.</i> 2013)
Pim-1, Protéine Kinase Mitogène-Activée 3 MAPKAPK3, Sérine Thréonine Kinase 3, Récepteur au facteur de croissance des fibroblastes 4 FGFR4	Colorectal		(Babel <i>et al.</i> 2009)
IMP1, p62, Koc, p53, c-myc, Cycline B1	Plusieurs		(Tan and Zhang 2008)
IMP1, p62, Koc, p53, c-myc, Cycline B1, Survivine	Plusieurs		(Casiano <i>et al.</i> 2006)
IMP1, p62/IMP2, Koc/IMP3, p53, c-myc, Cycline B1, Survivine, Ras, HER2/neu, p90, MAGE-1, NY-ESO-1, Bcl-2, p16	Plusieurs		(Zhang 2004)

Ces marqueurs peuvent se retrouver dans les tissus ainsi que dans le sang, mais aussi dans l'urine ou les selles, selon l'origine de la tumeur. La mesure de ces marqueurs pourrait alors permettre le diagnostic du cancer, avant même l'apparition de symptômes qui sont la plupart du temps à l'origine du diagnostic alors qu'ils sont généralement synonymes d'un stade avancé de la maladie. Cependant, ces marqueurs sont encore peu utilisés, notamment du fait de leur présence (en quantité inférieure) chez les individus sains, mais aussi du au manque de spécificité de certains d'entre eux. Très peu de ces marqueurs sont donc utilisés pour le diagnostic, et quand ils le sont, c'est en combinaison avec des analyses par biopsie par exemple. Des tests démontrant une grande sensibilité et spécificité seraient nécessaires à l'application plus large de la détection des marqueurs en clinique. Pour cela, ces tests devront permettre la détection non pas d'un marqueur, mais de l'association d'un panel de marqueurs sélectionnés pour être représentatifs de la pathologie.

1.2.4. TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DE DIAGNOSTIC DU CANCER

Le stade d'avancement de la maladie au moment du diagnostic étant un facteur d'une importante influence sur le pronostic de guérison, le développement de techniques pour la détection précoce des tumeurs est aujourd'hui l'un des défis important auquel sont confrontés les chercheurs en oncologie. A l'heure actuelle, les techniques conventionnellement utilisées sont la biopsie, par endoscopie ou par ponction, afin de réaliser des examens cytologiques, ainsi que les méthodes d'imagerie telles que la radiographie, le scanners de tomographie aux rayons X, le PET-Scan, qui associe l'utilisation du scanner avec un traceur radioactif, l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) ou les ultrasons utilisés dans l'échographie. Des techniques classiques sont utilisées spécifiquement pour le dépistage de certains types de cancers, tel que la mammographie pour le cancer du sein (radiographie appliquée à cette zone), le test de Papanicolaou pour le cancer du col de l'utérus, la détection de PSA pour le cancer de la prostate (complété par biopsie), ou encore la détection de sang occulte dans les selles pour le cancer du colon.

Ces techniques présentent cependant des inconvénients majeurs. Les méthodes par biopsie ont un caractère invasif, qui dépend de la localisation de la tumeur (une biopsie du poumon ou du foie est plus invasive qu'une biopsie de la peau par exemple). De plus, pour qu'elles soient efficaces il est nécessaire de connaître la localisation exacte de la tumeur pour le prélèvement. De leur côté, les techniques d'imageries sont basées sur des appareillages extrêmement coûteux, et donc peu accessibles dans les pays en voie de développement, d'autant plus que le choix de la méthode à utiliser est dépendante du type de cancer suspecté (radiographie mammaire pour le cancer du sein, IRM pour le cancer du cerveau...).

Le dosage de marqueurs tumoraux pour le diagnostic ne fait pas partie des recommandations des fondations telles que l'ARC. Il existe cependant des tests pratiqués, utilisés comme un indicateur de risque à confirmer par d'autres analyses, avec le dosage de PSA par exemple. Ces systèmes ont une utilité limitée, du fait notamment du manque de spécificité des marqueurs utilisés individuellement. En effet, les patients atteints de cancer n'expriment pas les mêmes marqueurs, ni aux mêmes concentrations, il serait nécessaire d'améliorer la portée de ces tests en appliquant le principe de la reconnaissance immunologique à un panel de marqueurs spécifiques de la pathologie. De nouveaux systèmes sont en cours de développement, basés sur la détection multiparamétrique de marqueurs. On peut citer notamment l'utilisation de la cytométrie de flux, qui pourrait permettre la détection de marqueurs à la surface des cellules, à l'aide de la reconnaissance de ces antigènes par des anticorps couplés à des marqueurs fluorescents (Frelinger *et al.* 2010). Les biopuces sont d'autres systèmes de détection multiparamétrique qui ont été largement décrits ces dernières années, et sont prometteurs quant à leur utilité pour le diagnostic du cancer (Lynch *et al.* 2004, Stoeva *et al.* 2006, Wilson and Nie 2006, Chen *et al.* 2009, Anderson *et al.* 2010, Rusling *et al.* 2010, Matarraz *et al.* 2011b, Yang *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012).

2. ETAT DE L'ART DE LA DETECTION DE BIOMARQUEURS

2.1. IMMUNOTESTS

Les biomarqueurs de cancer et d'allergie étant des anticorps spécifiques ou des antigènes présents de façon anormale, conduisant à la production d'anticorps, les méthodes les plus adaptées à la détection de ces marqueurs sont celles mettant en jeu des réactions d'immuno-reconnaissance. Ces réactions ont pour support le couple antigène-anticorps, classiquement utilisé en immunotest.

2.1.1. LES ANTICORPS

2.1.1.1. STRUCTURE ET FONCTION

Les immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines pourvues d'une fonction anticorps. Elles sont présentes sous forme soluble dans le plasma et dans de nombreuses sécrétions, ainsi que sous forme membranaire comme élément du récepteur de l'antigène à la surface des lymphocytes B. Elles sont synthétisées par les plasmocytes et sont support de l'immunité humorale. Toutes les immunoglobulines ont une structure de base, définie par les travaux de Porter-Edelman en 1958, illustrée sur la Figure 2-3. Elles sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H) identiques, associées à deux chaînes légères (L) identiques, et d'un nombre variable de chaînes glucidiques. Les chaînes lourdes, reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures, leur nombre varie selon l'isotype (γ , α , μ , δ ou ϵ). Elles ont une masse moléculaire d'environ 50 kDa (450 acides aminés). Les chaînes légères sont reliées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures, elles ont une masse moléculaire d'environ 25 kDa (212 acides aminés). La région constituée par les chaînes légères est très flexible, de façon à faciliter leur liaison aux antigènes. Ces protéines sont organisées en domaines : quatre pour les chaînes lourdes (sauf pour les IgM et IgE, constitués de chaînes lourdes à 5 domaines), et deux pour les chaînes légères. Les régions C-terminales sont dites constantes, et les régions N-terminales sont variables. Les domaines variables constituent le paratope, responsable de la reconnaissance de l'épitope de l'antigène, les domaines constants sont eux responsables de l'activité biologique (fragment Fc permettant l'activation de la voie du complément, la liaison à des récepteurs spécifiques portés par les lymphocytes ou les macrophages, le catabolisme des Ig, et le passage transplacentaire).

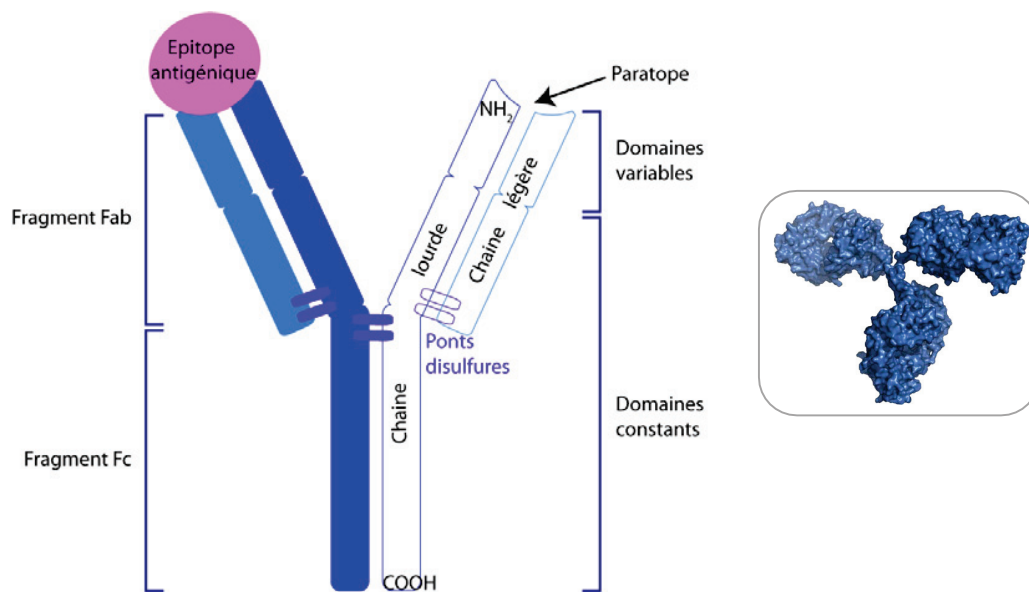


Figure 2-3. Structure générale d'une immunoglobuline
Encart : représentation 3D d'une IgG (source : protein data bank, code : 1igt)

Il existe cinq classes d'Ig. Par ordre d'abondance, on trouve les IgG, représentant environ 75% des Ig sériques, les IgA (présentes dans les sécrétions exocrines), les IgM (constitués de 5 monomères reliés en pentamère par des ponts disulfures), les IgD (classe la moins connue sur le plan structural et fonctionnel) et les IgE, les plus faiblement représentées dans le sérum et ayant un rôle biologique fondamental dans l'hypersensibilité de type I (allergies) (la fixation d'un antigène multivalent à deux IgE impliquant la dégranulation des basophiles et des mastocytes).

2.1.2. PRINCIPE DES IMMUNOESSAIS

Il existe différentes configurations d'immunoessai, permettant de détecter des interactions entre des anticorps et leurs antigènes : le marquage direct, le sandwich, la capture et la compétition. Elles sont décrites ci-après.

2.1.2.1. MARQUAGE DIRECT

La première étape de cette stratégie consiste à marquer les biomolécules présentes dans l'échantillon à analyser, afin de pouvoir procéder ultérieurement à leur détection. L'échantillon est alors incubé sur le support fonctionnalisé par des anticorps spécifiques des biomolécules d'intérêt (ou par des antigènes si les molécules cibles sont les anticorps). L'élimination des molécules n'ayant pas interagi est réalisée grâce à une étape de lavage. La présence du marqueur témoigne de l'interaction antigène/anticorps, et est quantifiée afin de déterminer la concentration des cibles détectées. La principale difficulté de cette méthode réside dans la réalisation du marquage des biomolécules dans l'échantillon. Cette étape est relativement complexe et induit des risques d'erreurs importants.

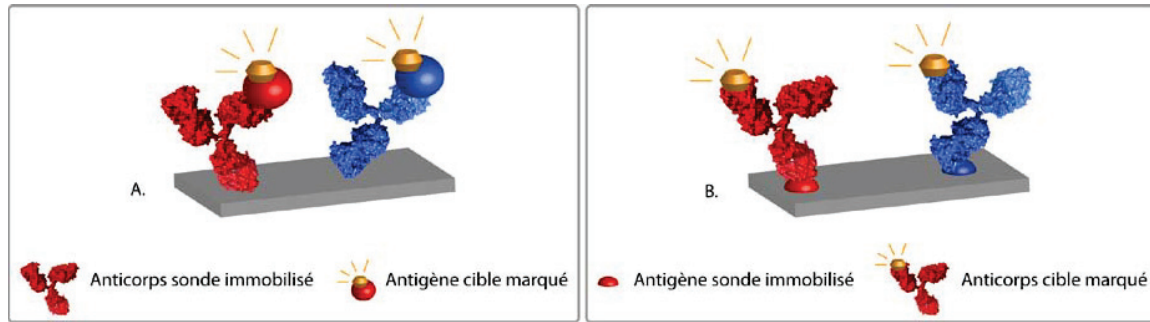


Figure 2-4. Immunoessai par marquage direct

A. pour la détection d'antigènes (anticorps immobilisés), B. pour la détection d'anticorps (antigènes immobilisés)

2.1.2.2. SANDWICH

Une autre approche basée sur l'immobilisation des anticorps spécifiques sur le support, est la méthode dite « sandwich ». Plus utilisée, elle consiste à utiliser l'échantillon tel quel pour l'incubation sur le support, puis à la détection des interactions à l'aide de seconds anticorps, également spécifiques des molécules cibles mais reconnaissant un épitope différent, fonctionnalisés par un marqueur. Ces essais sont considérés comme étant très sélectifs, du fait de la double reconnaissance, par l'anticorps sonde puis par l'anticorps marqué. Cependant, la double reconnaissance n'est possible que pour les molécules présentant au moins deux épitopes, l'utilisation de cette méthode n'est donc pas envisageable pour la détection de petites molécules cibles telles que les pesticides ou explosifs par exemple.

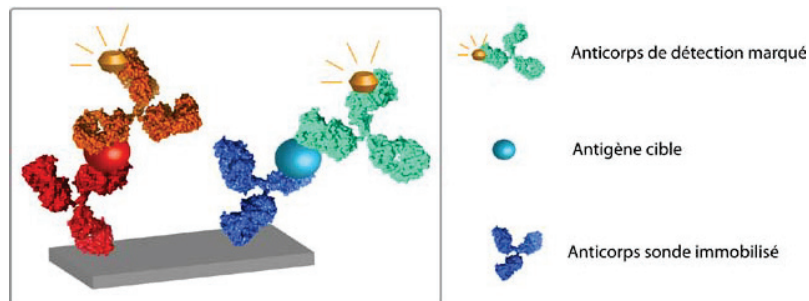


Figure 2-5. Immunoessai en mode sandwich

2.1.2.3. CAPTURE

La configuration dite « capture » réside cette fois dans l'immobilisation d'antigènes sur le support. Cette approche est donc utilisée pour détecter la présence d'anticorps cibles. Un échantillon biologique est incubé sur le support, et l'interaction des anticorps cibles intervient par reconnaissance des antigènes sondes. Un second anticorps, dirigé généralement contre l'ensemble de la classe d'anticorps à doser, est utilisé marqué pour la détection de l'interaction. C'est ce type d'immunoessai qui sera mis en œuvre pour le diagnostic des allergies et du cancer dans le cadre de cette thèse. Il peut être réalisé en une ou deux étapes d'incubation. Dans le premier cas, l'échantillon est d'abord incubé avec les anticorps secondaires. De cette façon, l'ensemble des anticorps présents sont marqués. Cela peut diminuer la

sensibilité, et générer un signal non spécifique important. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-IgG pour le marquage d'IgG sérique induit le marquage d'un grand nombre de molécules toutes mises au même niveau face à l'interaction. Ceci peut induire un manque de sensibilité, et générer des erreurs de diagnostic. Néanmoins, pour des classes d'anticorps moins représentées dans l'échantillon, telles que les IgE dans le sérum, une bonne sensibilité peut être obtenue à l'aide d'un immunoessai en mode capture en une étape, tout en représentant un gain de temps non négligeable.

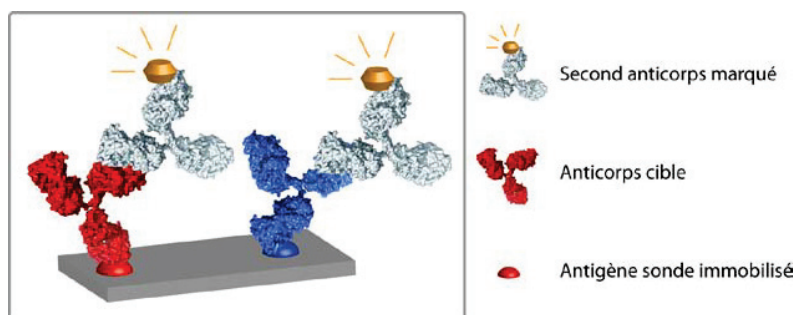


Figure 2-6. Immunoessai en mode capture

2.1.2.4. COMPETITION

Enfin, la dernière configuration envisagée est basée sur l'inhibition compétitive de la reconnaissance antigène-anticorps. Elle s'effectue en mode indirect. C'est-à-dire que contrairement aux méthodes précédemment décrites, le signal ne sera pas proportionnel à la concentration en cibles dans l'échantillon, mais inversement proportionnel. En pratique, des antigènes sondes sont immobilisés sur le support, et mis en présence d'un mélange comprenant l'échantillon à analyser et les anticorps spécifiques correspondant aux antigènes immobilisés. Les anticorps interagiront donc avec les antigènes sondes si les cibles ne sont pas présentes dans l'échantillon, et plus la concentration en cible sera importante, moins les anticorps interagiront avec les sondes.

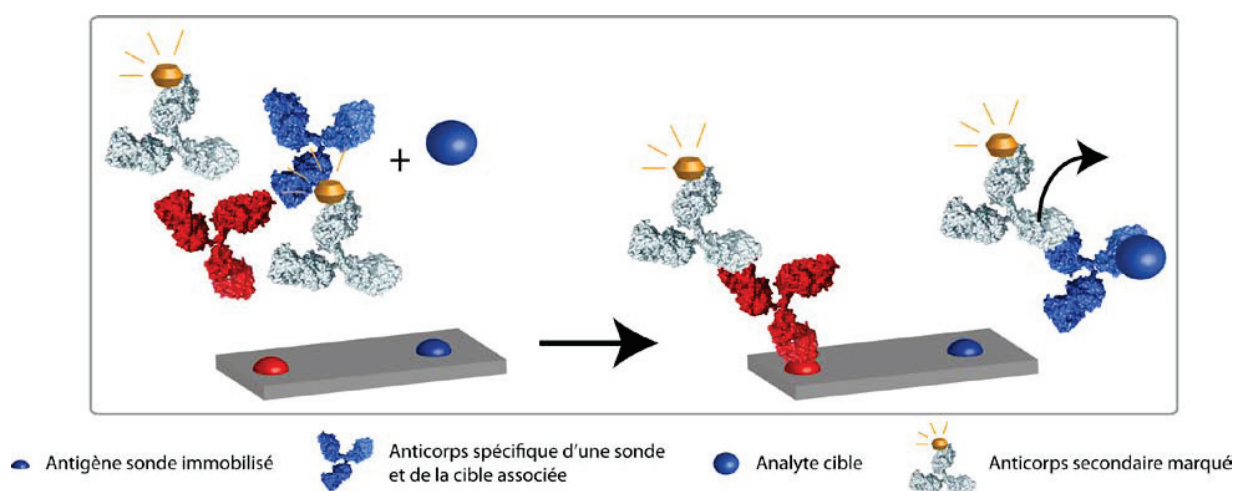


Figure 2-7. Immunoessai en mode compétitif

Ces méthodes sont particulièrement adaptées au diagnostic mais elles sont aussi très largement appliquées à la détection de molécules pour d'autres buts. Par exemple, la détection de produits dopants dans les fluides biologiques chez les sportifs, ou d'autres molécules témoignant de la prise de produits illicites. Mais aussi, au-delà des tests sur échantillons biologiques, elles peuvent être appliquées au contrôle environnemental ou à la surveillance sanitaire par l'analyse des eaux, des produits de consommation alimentaire et autre. On trouve également des applications pour la sécurité, telles que l'analyse des produits liquides dans les bagages des avions, et la liste des applications possibles est encore très longue. Dans ce chapitre, nous nous limiterons à la description et à la comparaison des performances de ces méthodes pour leur application à la détection de marqueurs pour le diagnostic du cancer et de l'allergie.

2.2. DETECTION D'IGE ET DIAGNOSTIC DES ALLERGIES

2.2.1. UTILISATION D'EXTRAITS D'ALLERGENES

Le diagnostic des allergies IgE dépendantes commence généralement par l'interrogatoire du patient sur l'historique de ses symptômes, et l'éventuelle association avec un contact potentiellement allergisant. L'étape suivante consiste en l'utilisation de tests cutanés, de façon à tester la réaction à certains allergènes, ainsi qu'à la réalisation de dosages sérologiques des IgE spécifiques potentiellement présents chez les patients. Pour ces deux approches, des extraits d'allergènes sont généralement utilisés. Avec l'avènement des tests *in vitro* et les progrès effectués en biotechnologies, ces extraits ont été utilisés dans le développement d'immunotests multiparamétriques destinés au diagnostic des allergies.

Cependant, les extraits d'allergènes utilisés classiquement présentent plusieurs inconvénients. Tout d'abord, étant donné qu'ils consistent en des mélanges de composés allergènes et non-allergènes, ils permettent l'identification de la source d'allergènes mais pas la molécule entraînant la réaction. Le diagnostic basé sur des extraits d'allergènes ne permettant donc pas l'obtention d'un profil de réactivité spécifique des patients, il ne donne pas non plus d'information sur les molécules à cibler pour la réalisation d'immunothérapie. D'autres limitations majeures sont rencontrées pour le diagnostic. La qualité des extraits par exemple est souvent contestée, du fait de la contamination par d'autres sources. De plus, des problèmes de stabilité sont observés, ceux-ci sont probablement associés à la dégradation des extraits par les enzymes protéolytiques qu'ils contiennent, conduisant à une représentation incorrecte des composés dégradés, et à des risques de résultats faux-négatifs (Deinhofer *et al.* 2004). Les molécules allergènes présentes en faible quantité dans les extraits sont également difficiles à détecter. La probabilité d'obtention de résultats faux-positifs est également plus importante, du fait des épitopes glucidiques ayant potentiellement une réactivité croisée (Bhalla and Singh 2008).

2.2.2. UTILISATION D'ALLERGENES RECOMBINANTS

La production de protéines recombinantes par des méthodes de biologie moléculaire a présenté un atout majeur dans le développement de tests diagnostiques. En effet, l'utilisation de ces protéines purifiées en remplacement des extraits naturels d'allergènes a permis d'obtenir non seulement une

meilleure sensibilité et reproductibilité des tests *in vitro*, mais également de cibler plus précisément les protéines responsables de la réaction allergique (Scheurer 2006). Cette approche de diagnostic plus résolutif, appelée *component-resolved diagnosis* (CRD) est actuellement la stratégie privilégiée pour le développement de biopuces, qui permettent d'obtenir des performances comparables à celles des systèmes traditionnels tels que les systèmes CAP (Phadia) (Wiltshire *et al.* 2000, Deinhofer *et al.* 2004, Ott *et al.* 2006). Un très grand nombre de protéines allergènes ont été décrites et sont commercialement disponibles pour les tests diagnostiques, ou le seront bientôt (Sastre 2010).

L'utilisation de protéines recombinantes a introduit de nouveaux enjeux. En effet, avec ce type d'approche, un nombre plus important de sondes doit être intégré au test du fait qu'à un extrait correspondent plusieurs protéines recombinantes. Plusieurs composés pouvant être impliqués dans la réaction allergique, la réponse de chacun doit être analysée, quantifiée et comparée avec celle de l'extrait correspondant. L'utilisation de protéines recombinantes doit également être contrôlée du fait des possibles changements conformationnels, pouvant toucher les épitopes réactifs. Les allergènes recombinants ont cependant été largement produits et caractérisés afin de permettre l'amélioration du diagnostic mais également leur utilisation thérapeutique et à visée préventive (Valenta and Kraft 2004).

Il est à noter que l'utilisation de protéines recombinantes permet de réfléchir en termes de familles moléculaires. La notion de panallergènes est apparue avec la découverte de l'implication de certaines protéines ubiquitaires, de structure conservée présentes dans des organismes de groupe taxonomique différents. Par exemple la profiline est décrite depuis 1992 comme un panallergène, présent dans de nombreux pollens (bouleau, armoise, ambroisie, olivier...). Cette protéine peut participer à la réaction allergique, et être responsable de la sensibilité du patient à cette famille d'allergènes (Valenta *et al.* 1992). Les panallergènes font donc partie des cibles à détecter pour établir un diagnostic de qualité.

2.2.3. BIOPUCES A ALLERGENES

Bien qu'il soit possible de détecter différents IgE allergènes-spécifiques grâce à des immunotests monoparamétriques tels que les ELISA, ceux-ci représentent un coût, un temps d'expérimentation et un volume de réactifs et d'échantillons assez important. Avec l'augmentation des allergies, il était nécessaire de développer de nouveaux systèmes rapides et économiques pour l'analyse de nombreux allergènes en un seul test. Une approche pour la miniaturisation a été mise en place avec la technologie des puces à protéines qui, en rendant possible l'immobilisation d'un grand nombre de sondes sur un support, a permis le test simultané de la réactivité des IgE contre un panel d'allergènes de plusieurs sources. La première puce à allergènes a été décrite en 2000 par Wiltshire (Wiltshire *et al.* 2000). Un avantage majeur réside dans les quantités de réactifs et d'échantillons nécessaires, largement inférieures aux tests monoparamétriques tels que les ELISA classiques. De plus, la quantité d'allergènes sondes présentés sur la puce pour l'interaction peut être finement contrôlée, de façon à ce qu'ils soient suffisamment représentés pour obtenir un signal détectable, mais pas en trop large excès. Ce contrôle permet de mimer les conditions *in vivo*, où de faibles concentrations d'allergènes sont présentes, sous forme de protéines isolées.

De très nombreuses études basées sur le concept de CRD ont été publiées récemment, avec des puces souvent dédiées à un type d'allergie (alimentaire, aéro-allergènes...), et parfois même à une sous-classe en particulier (allergènes de carottes, de lait de vache...). Un grand nombre de revues résument ces études. Vieths et son groupe ont par exemple décrits les différents modes de diagnostic des allergies alimentaires (Asero *et al.* 2007), ont passé en revue les articles présentant le CRD pour ce type d'allergies (Lidholm *et al.* 2006), et ont également réalisé des études consacrées aux allergies au kiwi (Le *et al.* 2013) ou à la carotte (Ballmer-Weber *et al.* 2012). Shreffler a présenté les forces et faiblesses de différentes biopuces pour le CRD et leurs applications récentes en particulier pour les allergies alimentaires et allergie au latex (Shreffler 2011). Lucas s'est intéressé à une vision d'ensemble de l'allergologie au niveau moléculaire, et des applications possibles au niveau d'une personnalisation du traitement (Lucas 2010).

De nombreuses publications sont consacrées aux systèmes de diagnostic des allergies sur biopuce, et à la comparaison des performances obtenues par rapport à celle des tests standards monoparamétriques tels que les ELISA ou les ImmunoCAP. Wöhrle *et al.* ont par exemple démontré l'utilité d'un test sur biopuce pour le diagnostic d'allergies impliquant un panel de protéines contenues dans des aéro-allergènes, dont certaines sont communes à ces différents allergènes (armoise et ambrosie), induisant une réactivité croisée. Le diagnostic différentiel entre les différents types de sensibilisation obtenu grâce à ce test représente un avantage considérable pour la sélection de sources d'allergènes dans le cadre d'un traitement par immunothérapie (Wöhrle *et al.* 2006). Une autre étude a démontré les performances d'un test sur biopuces, comparable à un test ImmunoCAP standard en termes de sensibilité et sélectivité, avec de très bonnes corrélations des résultats (Deinhofer *et al.* 2004)).

Les biopuces à allergènes ont jusqu'à présent majoritairement utilisé la détection fluorescente des IgE, soit en utilisant des anti-IgE marqués (Hiller *et al.* 2002, Harwanegg *et al.* 2003, Jahn-Schmid *et al.* 2003, Deinhofer *et al.* 2004, Cretich *et al.* 2010, Vigh-Conrad *et al.* 2010), soit en conjuguant d'abord les groupes d'IgE à de la biotine et en utilisant de la streptavidine marquée par un fluorophore (Kim *et al.* 2002). Une amélioration de la sensibilité a ensuite été démontrée, en remplaçant les méthodes de marquage fluorescent par des méthodes utilisant un marquage enzymatique (Lebrun *et al.* 2005). Les performances d'essais utilisant une détection chimiluminescente ont également été décrites (Fall *et al.* 2002). Plus récemment, des biopuces à allergènes utilisant une détection sans marquage à l'aide de mesure par SPR ont également été développées (Kim *et al.* 2010, Olkhov *et al.* 2012).

Une des critiques soulevées par les médecins à propos des biopuces pour le diagnostic multiparamétrique des allergies réside dans le manque de flexibilité du système. En effet, ils reprochent la rigidité des outils commerciaux, pour lesquels le panel d'allergènes immobilisés n'est pas personnalisable. Scala *et al.* ont alors présenté les outils de diagnostic des allergies sur billes comme une avancée permettant de répondre à ces critiques, par l'apport de flexibilité au test, dans lequel les allergènes et contrôles peuvent être directement sélectionnés par les utilisateurs (Pomponi *et al.* 2012, Scala *et al.* 2012).

La prochaine étape de développement sera probablement basée sur l'utilisation des épitopes allergènes seuls, et différenciés, afin de permettre un diagnostic encore plus précis. Des puces à peptides ont déjà été mises au point pour identifier les épitopes réactifs, on parle d'*epitope mapping*. De récentes études

ont suggéré que la sensibilité à un allergène, définie comme étant la combinaison de la sévérité de la réaction allergique et la dose d'allergène nécessaire pour provoquer la réaction, pourrait être corrélée avec le nombre d'épitopes reconnus par les IgE du patient. Ainsi, l'identification des interactions avec les différents épitopes d'un allergène pourrait devenir un outil supplémentaire pour le diagnostic de l'allergie et son pronostic. De plus, la caractérisation des épitopes allergènes permettrait une meilleure compréhension des mécanismes induisant la pathologie et pourrait alors contribuer à la mise au point de traitements mieux adaptés (Shreffler *et al.* 2005, Lin *et al.* 2009).

2.3. DIAGNOSTIC DU CANCER

Les méthodes traditionnelles de diagnostic du cancer, basées sur la biopsie ou l'imagerie médicale, sont invasives ou coûteuses et permettent rarement de diagnostiquer la maladie à un stade précoce. En effet, 60 % des patients avec un cancer du sein, du poumon, du colon ou des ovaires présentent déjà des colonies métastatiques au moment du diagnostic, et les thérapies conventionnelles n'ont des chances de succès que limitées une fois la tumeur étendue au-delà de son tissu d'origine. Ces dernières années, la présence de marqueurs de cancer dans le sérum des patients a été largement mise en évidence (Sidransky 2002, Luna Coronell *et al.* 2012). Ceux-ci apparaissant à un stade précoce, ils pourraient être détectés avant l'apparition des symptômes. De plus, la production d'auto-anticorps associés au cancer semble être induite par la modification ou l'expression anormale de protéines dans les cellules tumorales. Ces auto-anticorps peuvent être considérés comme des rapporteurs immunitaires du processus de tumorigenèse, et la présence d'une signature précise d'un panel d'auto-anticorps serait associée au type de cancer (Desmetz *et al.* 2009). De ce fait, antigènes associés aux tumeurs (TAA) et auto-anticorps pourraient être utilisés comme marqueurs de tumeur dans un but diagnostic. Le développement de techniques de détection directe dans les fluides biologiques de ces marqueurs représente alors un vrai défi, qui pourrait révolutionner non seulement le diagnostic mais aussi le suivi et la thérapie, en améliorant les chances de guérison des patients.

Les paragraphes suivants décrivent les outils développés pour les deux approches possibles, la première consistant à la détection des marqueurs (on se focalisera ici sur les antigènes associés aux tumeurs, la détection de mutations géniques ou de micro-ARN ne sera donc pas évoquée), et la seconde correspondant à la détection des auto-anticorps développés par le système immunitaire du patient. Un grand nombre de publications concernent les systèmes développés dans ce but, cette partie présentera un aperçu des méthodes en format de puce à protéines mises au point, sans prétention d'exhaustivité.

2.3.1. DETECTION D'ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS

La technologie des puces à anticorps est un outil très performant pour la détection et la quantification de protéines dans des échantillons biologiques. La capacité des anticorps à interagir de manière très spécifique avec les protéines rend cette configuration de puce à anticorps particulièrement adaptée pour la détection de protéines peu représentées dans un échantillon, ce qui est le cas des TAA par exemple. Ainsi, ce format permet non seulement l'identification de nouveaux marqueurs, mais aussi la détection de marqueurs connus, dans un but diagnostic. De nombreux systèmes de puces ont été développés pour

cela, s'appuyant sur les différentes méthodes présentées dans le chapitre 1. Certaines revues font la description de ces outils pour le diagnostic du cancer (Wang 2006, Rusling *et al.* 2010).

En 2003, le groupe de Petricoin a décrit le potentiel de l'utilisation de la protéomique pour le diagnostic précoce du cancer, avec l'identification d'un ensemble de protéines présentant une signature spécifique de la pathologie. La spectrométrie de masse est ici présentée comme un outil puissant pour l'identification de cette signature, associée à un algorithme permettant la répartition dans des groupes (atteint/sain) selon la signature obtenue. Une signature serait associée à un type de cancer, mais également au stade de la pathologie (Wulfschlegel *et al.* 2003). Cette approche a permis d'envisager une importante avancée pour le diagnostic du cancer, bien que la technologie employée soit encore très coûteuse et peu accessible pour l'analyse en routine. Ce type d'essai a été utilisé dans différentes études, appliquées à plusieurs types de cancer. Le même groupe l'a mis au point pour identifier notamment des patients atteints de cancer des ovaires (Petricoin *et al.* 2002). D'autres études se sont intéressées au cancer du sein, avec la différenciation entre plusieurs stades de cancer du sein (Li *et al.* 2002), ou avec l'identification de trois nouveaux marqueurs et la démonstration de l'amélioration de la sensibilité d'un modèle de détection concomitante de ces protéines avec le marqueur CA-125 par rapport à celle obtenue avec ce dernier seul (Zhang *et al.* 2004). Adam *et al.* se sont intéressés au cancer de la prostate, avec la discrimination par cette approche de sérums de patients atteints de cancer de la prostate, d'hyperplasie bénigne, ou de donneurs sains (Adam *et al.* 2002).

L'apport des nanotechnologies pour ces applications dans les différentes étapes de diagnostic, suivi et traitement du cancer a été également mis en évidence, avec la mise au point de différents systèmes (Nie *et al.* 2007, Chen *et al.* 2009, Choi *et al.* 2010). Des *nanobarcodes* ont par exemple été employés pour la détection ultrasensible de la PSA (Nam *et al.* 2003, Goluch *et al.* 2009) et plus récemment pour la détection multiparamétriques de plusieurs marqueurs, généralement par immunoessai en mode sandwich (Wu *et al.* 2001, Stoeva *et al.* 2006, Zheng and He 2010). Un autre exemple de l'apport des nanotechnologies pour la détection de protéines marqueurs de cancer a consisté en la mesure électrique de la présence de protéines cibles par un capteur sous la forme d'un réseau de nanofils fonctionnalisés par différents anticorps. La puce développée dans ce cadre a permis la détection multiparamétrique de biomarqueurs, par détection électrique sans marquage, en temps réel et avec une très bonne sensibilité et sélectivité (Zheng *et al.* 2005).

D'autres méthodes sans marquage ont été décrites, basées par exemple sur des capteurs piézoélectriques fonctionnalisés par des anticorps anti-AFP et anti-PSA pour la détection des marqueurs associés dans des échantillons de 1 μ L (Su *et al.* 2013). Des microleviers ont également été mis en œuvre pour la détection de marqueurs, mais la plupart du temps ils sont réservés à la détection d'un ou deux marqueurs, le multiplexage de ces méthodes n'étant pas encore très présent pour cette application (Wu *et al.* 2001, Wee *et al.* 2005, von Muhlen *et al.* 2010). Les systèmes de détection basés sur des mesures SPR présentent une autre alternative de détection sans marquage. Le groupe de Homola a par exemple mis au point un immunoessai multiparamétrique pour la détection de marqueurs de cancer par SPR. Les anticorps spécifiques sont immobilisés de façon localisée sur la puce, et leur interaction avec les marqueurs contenus dans le sérum est mesurée de façon très sensible par SPR (Ladd *et al.* 2009, Piliarik *et al.* 2010). Très récemment, le groupe de Li a démontré la possibilité de détecter des marqueurs de

cancer sécrétés par des cellules en culture sur un support compatible avec une mesure par SPR (Liu *et al.* 2012a). La preuve de concept a été réalisée avec des anticorps anti-VEGF immobilisés, pour une détection monoparamétrique, mais cette approche pourrait être appliquée à une détection de multiples marqueurs.

Les capteurs électrochimiques destinés au diagnostic du cancer par la détection de biomarqueurs ont également démontré leurs performances (Wang 2006, Chen *et al.* 2009, Chikkaveeraiah *et al.* 2012). Différents formats de puces ont été fabriqués pour cette application. Le groupe de Karube a par exemple mis au point un réseau d'électrodes, avec 36 électrodes de travail de platine modifiées par différents anticorps de capture. La détection de différents marqueurs a été effectuée en format sandwich utilisant un marquage enzymatique permettant la génération d'un produit électroactif, mesuré par ampérométrie (Kojima *et al.* 2003). Récemment, une puce électrochimique fabriquée par sérigraphie d'encre de carbone et modifiée par du graphène et des nanoparticules d'or a été décrite pour la détection multiparamétrique de marqueurs de cancer. Dans cette étude, le système repose sur l'immobilisation d'anticorps spécifiques à la surface de l'électrode, et sur un immunoessai en mode sandwich dans lequel les seconds anticorps sont marqués par un complexe phosphatase alcaline-clusters d'or – nanocomposites de graphène. Ce complexe permet la formation d'un dépôt d'argent à la surface de l'électrode, dont le signal est mesuré électrochimiquement (Ge *et al.* 2012).

Les méthodes de détection par mesures optiques sont toujours très employées. Les *Quantum dots* ont fait la preuve de leur utilité dans la détection du cancer, pour la mise en évidence de marqueurs de cancer dans des tissus ou des cellules ou pour l'imagerie des tumeurs (Nie *et al.* 2007), mais également pour la détection par fluorescence de marqueurs dans le sérum de patients. Une puce à protéines utilisant des *quantum dots* a notamment été développée pour la détection de six cytokines, et a démontré une très bonne sensibilité avec des limites de détection de l'ordre du picomolaire (Zajac *et al.* 2007). La détection multiparamétrique de marqueurs a aussi été réalisée en immunoessai en format sandwich, par fluorescence ou avec des systèmes sans marquages basés sur des cristaux photoniques (Huang *et al.* 2012). Une détection par fluorescence a également été utilisée sur des lames de verre modifiées par des membranes de nitrocellulose, pour établir et comparer par des méthodes chimiométriques les profils de réactivité d'un panel de protéines isolées de lignées de cellules d'adénocarcinome du poumon avec des échantillons de sérum de patients atteints de cancer du poumon (Qiu *et al.* 2004). Plus récemment, un immunoessai multiparamétrique en mode compétitif en suspension a été développé, dans lequel les marqueurs sondes sont couplés à des billes commercialisées par la société Luminex. Après incubation avec les échantillons, les interactions sont analysées par fluorescence (Liu *et al.* 2013b).

Plusieurs immunoessais multiparamétriques utilisant une détection chimiluminescente ont également été développés (Wang *et al.* 2012a, Zong *et al.* 2012). Le groupe de Walt a par exemple rapporté le développement d'un réseau de fibres optiques modifié par des billes de polystyrène pour détecter de multiples antigènes par électrochimiluminescence. Dans cette approche, les billes ont été fonctionnalisées par des anticorps de capture, puis mises en présence des échantillons à analyser contenant les protéines cibles et des anticorps spécifiques biotinylés. La streptavidine, couplée au $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, est ensuite capturée et les complexes sont collectés dans les micro-puits d'une électrode

formé par gravure des faisceaux de fibre optique et dépôt d'or. La présence des analytes est alors déterminée par mesure d'électrochimiluminescence, comme l'illustre la Figure 2-8 (Deiss *et al.* 2009). Un système en flux a aussi été mis au point pour la détection simultanée de quatre marqueurs de cancer, avec des anticorps immobilisés dans différents canaux, et l'utilisation d'anticorps spécifiques marqués par la phosphatase alcaline ou la peroxydase du raifort (Fu *et al.* 2007). Une puce sur lame de verre utilisant ces deux même enzymes a également été mise au point pour la détection de deux marqueurs par chimiluminescence et par colorimétrie (Wei *et al.* 2011).

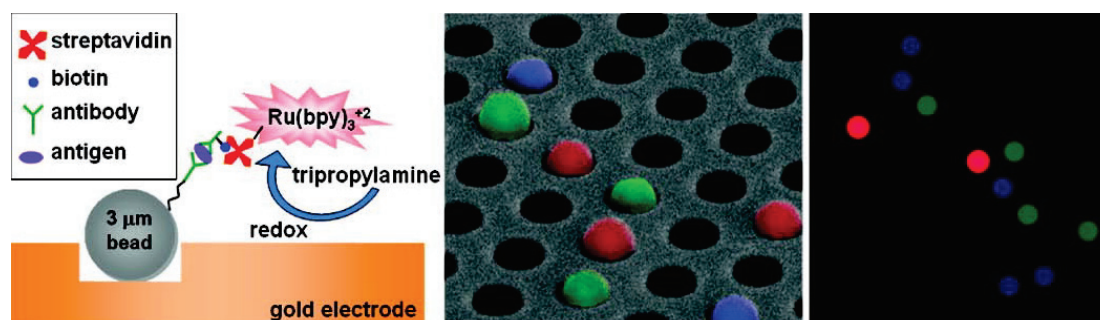


Figure 2-8. Système de détection multiparamétrique de TAA par électrochimiluminescence

(Extrait de Deiss *et al.* 2009) Le support consiste en un réseau de fibre optique modifié par une surface d'or présentant des micro-puits dans lesquels sont collectés des billes fonctionnalisées (schéma de gauche et image du centre). Ces billes font elle-même office de support de la réaction d'interaction avec les antigènes cibles. La présence de cibles dans un échantillon est déterminée par mesure d'électroluminescence (image de droite).

La colorimétrie enfin, est une approche intéressante pour la détection de marqueurs pour le diagnostic car l'analyse du signal ne requiert pas d'appareillage sophistiqué et coûteux. Ainsi, plusieurs immunoessais mono- puis multiparamétriques ont été décrits, basés sur cette méthode de détection (Yin *et al.* 2010). L'utilisation de nanoparticules peut dans ce but être envisagée, du fait de la propriété des nanoparticules d'or par exemple de générer un signal colorimétrique lors de leur agrégation (Nam *et al.* 2007), mais aussi avec un couplage à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré (Wang *et al.* 2009). Jusqu'à présent, les systèmes utilisant une détection colorimétrique n'ont été mis au point que pour la détection d'un faible nombre de marqueurs (deux le plus souvent).

Une étape importante dans le développement de ces puces consiste à optimiser l'ensemble des paramètres, afin d'obtenir la meilleure sensibilité et sélectivité possible. Une étude menée par l'équipe de Juncker a démontré le potentiel de l'optimisation des différents paramètres constituant le test, en utilisant la méthode de Taguchi. C'est une méthode statistique appliquée à la réalisation de plan d'expériences, dont l'objectif est la production de produits, de processus et de systèmes robustes et peu sensibles aux variations, dans le cadre d'une démarche qualité. Cette optimisation a été réalisée pour la détection de cinq marqueurs du cancer du sein, en deux étapes. Tout d'abord, les concentrations des anticorps de capture, des anticorps de détection et des analytes ont été optimisées, puis la composition des solutions tampon, la concentration du conjugué streptavidine-Cy5 ainsi que les temps d'incubation. L'optimisation de ces paramètres a permis d'améliorer la sensibilité jusqu'à 68 fois, et d'augmenter la valeur du signal maximal jusqu'à trois fois, démontrant ainsi l'importance de cette étape pour la réalisation d'une puce dédiée à un immunotest multiparamétrique (Luo *et al.* 2011).

Les puces à anticorps ont été largement utilisées pour la détection d'antigènes associés au cancer (Matarraz *et al.* 2011a). L'analyse multiparamétrique d'échantillons de sérum sur ce type de puces ne permet pas uniquement la découverte de nouveaux marqueurs, elle rend également envisageable le diagnostic précoce du cancer de façon rapide, non-invasive et à portée des laboratoires d'analyse. Cependant, les différents systèmes présentés doivent être éprouvés avec de larges cohortes de patients et de donneurs, afin de valider d'une part le choix des TAA détectés et leur significativité pour la différenciation entre les échantillons correspondant aux patients atteints ou sains, et d'autre part les performances des systèmes en termes de reproductibilité, sensibilité et sélectivité. De plus, ce type de système fait face à la nécessité d'obtenir des anticorps pour chacun des TAA cibles, qui soient caractérisés et qui présentent une réactivité et une sélectivité optimale. Un autre modèle de puce, basé sur la détection d'anticorps à l'aide d'antigènes immobilisés permettrait d'éviter cette contrainte. En effet, il est moins délicat de produire des protéines recombinantes ou purifiées similaires aux protéines *in vivo*, et qui présentent la même réactivité avec les anticorps. Ces puces pourraient alors être utilisées, pour détecter les auto-anticorps anti-TAA plutôt que les TAA eux-mêmes. Les systèmes basés sur ce modèle sont décrits dans le paragraphe suivant.

2.3.2. DETECTION D'ANTICORPS CONTRE LES ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS

Les anticorps anti-TAA n'ont pas été utilisés uniquement pour l'identification de TAA, ils représentent également une classe de biomarqueurs à part entière pour le diagnostic précoce du cancer, ainsi que des marqueurs potentiels pour le suivi du traitement. La présence de ces auto-anticorps dans le sérum dès les premiers stades de développement de la pathologie permettrait le diagnostic à un stade où le traitement est le plus efficace et où le pronostic associé est le meilleur (Desmetz *et al.* 2011, Martin *et al.* 2011). Un grand nombre d'auto-anticorps ont d'ores et déjà été décrits comme étant des marqueurs de cancer, grâce au développement de différents systèmes de criblage, passés en revue récemment (Tan *et al.* 2009, Martin *et al.* 2011, Pedersen and Wandall 2011). Kijanka et Murphy ont également passé en revue l'apport des puces à protéines pour la découverte de nouveaux auto-anticorps marqueurs, et pour leur utilisation dans le diagnostic (Kijanka and Murphy 2009).

La littérature comprend moins de publications décrivant le développement de systèmes de détection multiparamétrique d'auto-anticorps anti-TAA que d'outils pour la détection des TAA. Bien que la plupart des études soient basées sur la détection de peu de cibles (un ou deux auto-anticorps), certaines ont d'ores et déjà décrit la détection d'un plus large panel d'auto-anticorps, permettant d'améliorer la sensibilité et la spécificité des outils développés. Ce sont sur celles-ci que nous allons nous arrêter dans les paragraphes qui suivent.

En 2002, la première puce à protéine pour la détermination d'auto-anticorps présents spécifiquement dans le sérum de patients atteints de cancer du colon a été mise au point (Scanlan *et al.* 2002). Dans cette étude, les antigènes sondes ont été déposés sur des membranes de nitrocellulose (8 x 12 cm), mis en présence des échantillons de sérum puis d'anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline. Enfin, l'ajout d'un substrat de l'enzyme a permis la révélation des interactions par colorimétrie (Figure 2-9). 77 antigènes ont ainsi été testés pour leur réactivité avec les échantillons de sérum, et 13 d'entre eux se sont révélés n'être réactifs qu'avec les échantillons correspondant aux patients atteints de

cancer. Chacun des TAA pris individuellement présente une faible représentativité sur l'ensemble des échantillons de sérum. Cependant, grâce au panel des 13 TAA, 46 % des échantillons de sérum de patients ont pu être identifiés comme positifs grâce à la réactivité obtenue sur au moins l'un des 13 TAA.

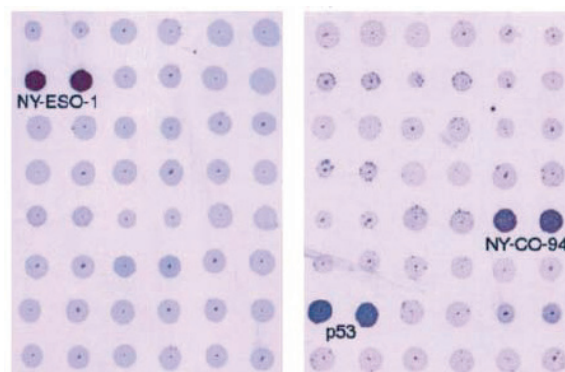


Figure 2-9. Image de la détection colorimétrique d'anticorps anti-TAA
(Extrait de Scanlan *et al.* 2002) Les différents plots correspondent aux TAA sondes immobilisés, et l'intensité du signal colorimétrique sur chaque plot dépend de la concentration en anticorps anti-TAA correspondant à la sonde présent dans l'échantillon.

Le groupe de Tan a ensuite utilisé un ELISA avec une matrice de sept TAA, permettant l'amélioration des performances de ce type d'essai (Zhang *et al.* 2003). L'immunoessai est ici réalisé par *coating* des TAA en fond de puits, incubation des échantillons puis d'anticorps secondaires marqués par la peroxydase du raifort, et finalement ajout d'un substrat de l'enzyme pour la génération d'un produit coloré. La détection des interactions est alors effectuée par mesure d'absorbance. Les auteurs ont ici choisi de discriminer les échantillons réactifs des non-réactifs pour chacun des TAA à l'aide d'un traitement statistique appelé test de Chi-deux (χ^2) : la moyenne du signal mesuré avec les échantillons de patients sains est additionnée de 3 déviations standard, afin de déterminer un « seuil de positivité » sur la sonde. La fréquence de positivité des échantillons pour chaque TAA pris individuellement s'est avérée variable mais dépassant rarement 20 %. Néanmoins, l'utilisation de l'ensemble des TAA du panel a permis d'augmenter la proportion d'échantillons réactifs jusqu'à 68 %. En outre, les échantillons provenant de patients atteints de cancer du sein, de la prostate ou du poumon ont révélé des profils de réactivité différents sur le panel de TAA, laissant envisager la possibilité de discriminer ces types de cancer à l'aide de ce type de test. Le même groupe a ensuite appliqué ce test à la détection d'auto-anticorps dirigés contre un panel de huit TAA, dans des échantillons de sérum de patients sains ou atteints d'hépatite chronique, de cirrhose du foie, ou de carcinome hépatocellulaire (HCC), en envisageant la possibilité de distinguer ces pathologies en fonction de la réponse des auto-anticorps (Zhang *et al.* 2007). Le pourcentage de positivité des échantillons pour au moins l'un des TAA du panel s'est effectivement révélé être plus élevé pour les échantillons correspondant aux patients atteints de HCC (58,9 %) que d'hépatite (20 %) ou de cirrhose (30 %), démontrant une augmentation de la réponse immunitaire associée à la gravité de la pathologie. Cependant, comme le montrent ces chiffres, ce panel ne permet pas de différencier avec certitude la pathologie des patients. D'autres études de ce groupe ont porté sur l'utilisation d'un panel comportant différents TAA tels que la survivine, p53 et c-myc d'une part

(Meghiorino *et al.* 2005), p62 et Koc d'autre part (Zhang *et al.* 2001) ou encore un panel de six TAA dont p90, p62 pour le diagnostic du cancer de la prostate (Shi *et al.* 2005).

Chapman *et al.* ont pour leur part, décrit l'utilisation d'un panel de six TAA pour la détection des auto-anticorps correspondants, afin de réaliser le diagnostic du cancer du sein ou de lésions mammaires précancéreuses. Leur essai, basé sur un ELISA classique présentant les 6 TAA sondes, a permis de discriminer les échantillons de sérum avec une sensibilité de 64 % pour les échantillons de patients atteints de cancer du sein et de 45 % pour ceux atteints de lésions précancéreuses, avec une spécificité de 85 % (Chapman *et al.* 2007). La même équipe a ensuite rapporté la mise au point d'un ELISA pour la détection d'auto-anticorps contre six TAA associés au cancer au poumon. Le panel de trois cohortes de patients atteints utilisé dans cette étude a démontré une sensibilité et spécificité moyenne de 37 % et 90 % respectivement (Boyle *et al.* 2011). Ces analyses ont été réalisées par le même type de traitement statistique que celui précédemment décrit (χ^2).

L'équipe de Chinnaiyan a mis au point une puce pour la détection par mesure de fluorescence d'une signature d'auto-anticorps marqueurs du cancer de la prostate, basée sur la construction d'une banque de protéines portée par des phages. Quatre protéines du panel ont montré une réactivité plus importante avec des sérums de patients atteints de cancer de la prostate par rapport aux échantillons correspondant à des donneurs sains (Wang *et al.* 2005).

Anderson *et al.* ont mis au point un système de criblage pour la détection d'auto-anticorps, à partir d'une banque de TAA potentiels. Cette étude repose sur la réalisation de trois étapes de criblage avec différentes cohortes d'échantillons de sérum de patients et de contrôles. Les antigènes ont alors été sélectionnés si le 95^{ème} centile (la valeur du signal pour laquelle 95 % des échantillons donnent un signal inférieur) est significativement différent entre les échantillons de patients atteints et ceux de patients contrôles, et si un nombre significatif d'échantillon de sérum de patients atteint a une valeur supérieure au 95^{ème} centile des échantillons de patients contrôles. La réalisation de ces trois étapes a confirmé 28 antigènes comme étant des cibles d'auto-anticorps associés au cancer du sein et absents chez les contrôles. Ce panel a alors permis la classification des échantillons selon ces deux classes avec 80,8 % de sensibilité et 61,6 % de spécificité (Anderson *et al.* 2010).

O'Rourke *et al.* ont développé un immunotest en format de capture inverse pour la détection d'auto-anticorps spécifiquement présents dans le sérum de patients atteints de cancer de la prostate, et absents chez ceux atteints d'une hyperplasie bénigne de la prostate (HBP). Des anticorps bien caractérisés ont été utilisés comme sondes à la surface d'une lame de verre modifiée par des nanoparticules d'or, et ont été mis en présence de lysat cellulaire pour induire la capture des antigènes correspondant aux sondes. Les IgG présents dans des échantillons de sérum de patients atteints du cancer de la prostate et de HBP ont alors été purifiés, couplés à un marqueur fluorescent, et incubés sur les lames. Enfin, les interactions ont été identifiées en mesurant le signal fluorescent. Ce système a permis l'identification de signatures d'auto-anticorps spécifiques, permettant la différenciation des échantillons correspondant au cancer de la prostate de ceux atteints de HBP avec 95 % de sensibilité et 80 % de spécificité (O'Rourke *et al.* 2012).

Enfin, la détection d'auto-anticorps dirigés contre un panel de TAA a été très récemment rapportée par le groupe de Laurenceau, avec la mise au point d'une puce à protéine sur lame de verre, par détection en fluorescence (Yang *et al.* 2013). Le système a permis la détermination de 82,7 % des patients atteints de cancer du sein, à partir de cinq des TAA du panel et à l'aide d'une analyse statistique basée sur une approche similaire à celle qui a été utilisée auparavant et reprise dans cette thèse.

Le nombre de publications concernant le potentiel d'utilisation de panels de biomarqueurs (TAA ou auto-anticorps anti-TAA) pour le diagnostic du cancer démontre bien l'intérêt croissant porté à cette approche. Les puces à protéines ont été largement décrites comme des outils puissants pour cet objectif, et ont été utilisées avec de très nombreux marqueurs différents, que ce soit pour leur identification ou pour leur détection dans des échantillons à diagnostiquer. Néanmoins, le développement d'immunotests robustes combinant des qualités de multiplexage, de haut-débit, de faible coût et d'utilisation simple dédiés à la détection sensible et spécifique de marqueurs représente encore un défi, et d'importantes améliorations doivent être apportées aux outils existants avant d'envisager leur utilisation en routine pour le diagnostic du cancer.

Chapitre 3. Contrôle environnemental

1. DETECTION DE POLLUANTS POUR LE CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

A l'heure actuelle, la présence de polluants dans l'environnement est une préoccupation majeure. En effet, les effluents provenant de l'industrie chimique ou pharmaceutique, les eaux usées domestiques, les ruissellements de l'agriculture intensive, les déchets d'activité militaire ou terroriste, et même les toxines produites par certaines algues ou animaux sont autant de source de pollution s'accumulant dans l'environnement (les sols, l'eau des rivières, des fleuves ou encore des nappes souterraines, mais aussi les végétaux). Ces contaminants peuvent ensuite se retrouver dans la chaîne alimentaire, en s'accumulant dans les graisses des crustacés et poissons par exemple.

Les effets de ces différents composés sont multiples, et ils concernent entre autres la santé humaine. Au-delà des risques d'intoxication alimentaire liés à l'ingestion de toxines présentes dans l'alimentation par exemple, des effets cancérogènes ont été rapportés. De plus, ils seraient responsables de troubles tels que des dysfonctionnements des systèmes respiratoire, nerveux et digestif, de symptômes anémiques, d'irritations de la peau ou des yeux, ainsi que de perturbations du système endocrinien. La détection de ces différents types de contaminants est donc une problématique importante au niveau mondial, pour la santé, l'environnement, et la sécurité.

La présence simultanée de plusieurs types de polluants dans l'eau étant possible, des systèmes d'analyse multiparamétriques sont nécessaires pour procéder au contrôle de la qualité de l'eau. Outre l'utilisation de cellules ou de modèles animaux pour l'évaluation de la toxicité de différents contaminants, différentes méthodes d'analyse chimique sont aujourd'hui disponibles dans le but d'évaluer la qualité de l'eau. Les techniques actuellement plébiscitées par les organisations internationales telles que l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) des Etats Unis, l'Agence Européenne pour l'Environnement ou l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments concernent majoritairement les méthodes chromatographiques (en phase gazeuse, en phase liquide à haute performance) couplées à une détection par spectrométrie de masse ou à capture d'électrons, ainsi que les techniques d'électrophorèse capillaire. Cependant, ces méthodes sont généralement longues et coûteuses, puisqu'elles nécessitent un équipement sophistiqué, une préparation des échantillons laborieuse, et un personnel qualifié.

Dans le but de faire face à ce problème, il apparait une demande croissante pour de nouveaux outils de contrôle de la qualité de l'eau. Ces nouveaux systèmes d'analyse devront représenter un faible coût, être sensibles, rapides et fiables et permettre l'analyse à haut-débit d'un grand nombre d'échantillons. Parmi les outils développés, les capteurs optiques, électrochimiques et de masse sont les plus représentés. Ceux basés sur des immunoessais sont particulièrement décrits, du fait entre autres de leur sélectivité et de la standardisation et possibilité d'automatisation de leurs protocoles. Les immunotests monoparamétriques ont notamment démontré leurs performances pour la détection sensible et sélective de différentes sources de polluants. Cependant, la plupart des systèmes développés à l'heure actuelle sont dédiés à la détection de peu de sources de polluants différents, et ces outils gagneraient à voir ce point amélioré, pour pouvoir être utilisés dans l'analyse systématique de l'eau. Les paragraphes suivants s'intéressent aux systèmes récemment développés pour la détection de différents polluants cibles : les pesticides, les phycotoxines, et les explosifs.

1.1. PESTICIDES

Le terme de pesticide est généralement utilisé pour des composés chimiques dédiés au contrôle et à l'élimination des nuisibles et des maladies des cultures. Ils peuvent être herbicides, fongicides ou insecticides, et impliquent différents composés chimiques tels que les carbamates, les organophosphorés, les triazines, les acides phénoxyalcanoïques ou encore les triazoles. Tous peuvent avoir des effets toxiques, c'est pourquoi une réglementation est en place pour leur utilisation, et pour les seuils tolérés dans l'eau. Comme pour la majorité des polluants, les méthodes plébiscitées à l'heure actuelle pour la détection des pesticides sont la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, et l'électrophorèse capillaire (EPA 2000, EPA 2005a, EPA 2005b). Cependant, du fait des inconvénients déjà cités de ces méthodes, différents types de systèmes ont été développés ces vingt dernières années.

Une grande majorité des méthodes de détection des pesticides est basée sur des systèmes d'immunotests. Plusieurs études ont passé en revue ces systèmes, dès 1992 (Sherry and Clement 1992, Meulenberg *et al.* 1995, Nunes *et al.* 1998, Schobel *et al.* 2000, Morozova *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2008, Raman Suri *et al.* 2009, Jiang and Fan 2012). Cependant, la majorité de ceux-ci a jusqu'à présent été appliquée à la détection d'une seule cible. Par exemple, bien qu'un très grand nombre de capteurs électrochimiques ait été décrit (biocapteurs notamment), l'analyse de la littérature n'a permis de trouver que très peu de publications concernant l'application des méthodes de mesure électrochimiques à la détection de plusieurs cibles simultanément. De même, des études ont démontré le potentiel des systèmes de micro-leviers (Suri *et al.* 2008) et des nanotechnologies de manière générale (Aragay *et al.* 2012) pour la détection de pesticides, mais presque exclusivement de façon monoparamétrique. Or l'un des principaux critères requis pour l'application en routine des nouveaux systèmes d'analyse réside en la possibilité de détecter plusieurs cibles simultanément. Les paragraphes ci-après sont consacrés à la description de ces systèmes, en se basant sur des exemples tirés de la littérature.

1.1.1. SYSTEMES DE DETECTION BASES SUR DES IMMUNOTESTS

Des exemples d'immunotests multi-analytes ont été rapportés, portant sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant un ensemble de polluants d'une même classe ou la co-immobilisation de différents anticorps (Zhang *et al.* 2011, Jiang and Fan 2012). Cette seconde approche est privilégiée, étant donné que la première ne permet pas de différencier les cibles reconnues. Différents types de test ont alors été développés. Des essais consistant en l'immobilisation localisée de plusieurs sondes ont été décrits, mais également des méthodes d'analyse en flux (sur papier ou dans des canaux par exemple), ainsi que des systèmes en suspension. Les principales techniques de détection consistent en des méthodes optiques, en particulier la fluorescence mais aussi la chimiluminescence, la spectrométrie ou la SPR. Bien que de nombreuses études concernent l'immunodétection monoparamétrique de pesticides par des méthodes électrochimiques, il n'en existe pas à notre connaissance pour l'analyse multiparamétrique.

Les systèmes d'immunotest en flux pour la détection de polluants ont été largement rapportés ces dernières années (Llorent-Martínez *et al.* 2011). Ils sont généralement basés sur deux modèles : soit des canaux microfluidiques, soit des supports poreux de type membrane pour des essais en flux latéral.

Le groupe de Niessner a quand à lui mis au point un immunoessai multiparamétrique sur lame de verre à détection chimiluminescente pour la détection de 2,4-D, de différents composés de la famille des triazines et d'un explosif (le TNT). Leur étude a porté sur deux formats : soit les haptènes sont immobilisés, soit ce sont les anticorps. Dans le premier cas, l'essai est réalisé par compétition, et dans le second en mode sandwich, avec un marquage enzymatique dans les deux cas. Ces systèmes ont démontré une très bonne sensibilité, avec des limites de détection allant jusqu'à 20 ng/L (Weller *et al.* 1999). En 2002, l'équipe de Gauglitz a mis au point un immunocapteur pour la détection par réflexion totale interne de fluorescence d'atrazine, de pentachlorophénol et d'alachlore d'une part, et d'atrazine, de simazine et d'isoproturon d'autre part. Un module d'injection dans le flux a été intégré au système et connecté à un échantillonneur automatique, afin de réaliser l'analyse. L'outil développé a ainsi permis la détection de ces six pesticides avec des limites de détection comprises entre 30 ng/L et 4,23 µg/L (Barzen *et al.* 2002). Un capteur basé sur une mesure SPR en multicanaux a été ensuite développé par le groupe de Homola, pour la détection de perturbateurs endocriniens dont l'atrazine, le benzopyrène, le 2,4-D et le 4-nonylphénol. Dans cette étude, les haptènes ont été conjugués à des protéines immobilisées sur la surface d'or d'un prisme de SPR, puis mis en présence de l'échantillon contenant les analytes cibles et les anticorps correspondants. L'immunoessai est donc réalisé en mode compétitif, et la fixation des anticorps est détectée par mesure de SPR au niveau des canaux correspondant aux différentes sondes immobilisées. Les limites de détection obtenues, déterminées à l'aide d'une fonction logistique, ont été comprises entre 50 et 160 ng/L. Cependant, d'importantes réactions croisées ont été observées pour certains anticorps, pouvant conduire à de mauvaises interprétations des résultats (Dostálek *et al.* 2007). La même année, le groupe de Lechuga a également rapporté un système similaire, pour la détection de DDT, de chlorpyrifos et de carbaryl, avec des limites de détection comprises entre 18 et 50 ng/L (Mauriz *et al.* 2007).

D'autres types de systèmes en flux ont été rapportés, basés cette fois sur des supports de type bandelettes de papier. Gabaldon *et al.* ont par exemple décrit un immunotest sur bandelette pour la détection d'atrazine et de carbaryl. Avec un temps d'analyse très court (20 minutes, comportant une étape d'extraction) et une détection par colorimétrie induite par l'utilisation d'une enzyme. L'outil développé a permis la détection des deux pesticides avec des limites de détection de 10 et 200 µg/L dans un échantillon, et des valeurs de détermination satisfaisantes dans des échantillons de légumes artificiellement contaminés par des cibles (Gabaldón *et al.* 2003). Mastichiadis *et al.* ont aussi utilisé ce type de système pour la détection de 4 pesticides par mesure de fluorescence, basé sur un format de type capillaire de polystyrène. Cet immunotest multiparamétrique a permis la détection de mésotrione, de paraquat, de diquat, et d'hexaconazole avec des limites de détection comprises entre 40 et 100 ng/L (Mastichiadis *et al.* 2002). Guo *et al.* ont également mis au point un système sur bandelette de nitrocellulose, pour la détection simultanée de carbofurane et de triazophos à l'aide d'un marquage par des particules d'or. Les haptènes ont été conjugués avec une protéine puis immobilisés sur le support sur deux lignes distinctes, avec une ligne supplémentaire pour le contrôle positif composé d'IgG. Des anticorps dirigés contre les pesticides ont été marqués par des particules d'or, et lyophilisés sur la partie « réservoir » du support. Ce marquage induit le développement d'une couleur rouge dont l'intensité varie avec la quantité de particules présentes, et donc de cibles dans l'échantillon. Des limites de détection de 4 et 32 µg/L ont été déterminées, pour une durée de test de 10 minutes (Guo *et al.* 2009).

Le même type de test a été mis au point pour la détection de carbaryl et d'endosulfane, avec une détection comparée entre un marquage enzymatique et un marquage par des particules d'or. Le second type de marquage s'est avéré plus performant, avec des limites de détection de 10 µg/L et 1 µg/L au lieu de 100 et 10 µg/L pour le marquage enzymatique (Zhang *et al.* 2006).

Quelques exemples d'immunotests multiparamétriques en suspension ont également été rapportés. En 2004, l'équipe de Snawder a par exemple développé un premier outil basé sur la technologie Luminex, pour la détection d'atrazine, de métholachlore mercapturate et de glyphosate dans des échantillons d'eau ou d'urine diluée. Cet essai en suspension utilisant une détection fluorescente a permis d'obtenir une sensibilité de 0,1 µg/L en moyenne pour les trois polluants cibles. 288 analyses séparées peuvent être effectuées en 120 minutes environ à l'aide de ce test basé sur un format de plaque 96 puits et d'un auto-échantillonneur (Biagini *et al.* 2004). En 2012, Liu *et al.* ont à leur tour développé un essai multiparamétrique en suspension sur microbilles pour la détection de sept cibles, mêlant pesticides et médicaments (Liu *et al.* 2013a). Les petites molécules sondes ont été conjuguées à des protéines, puis à des microbilles, tandis que les anticorps spécifiques ont été biotinylés. Les échantillons contenant les cibles ont été alors mis en présence des conjugués et des anticorps, pour la réalisation de l'essai en compétition. Ce système a démontré une bonne sensibilité, avec des limites de détection variant entre 0,05 µg/L et 2 µg/L. Très récemment, un autre système basé sur la technologie Luminex a été décrit, pour la détection simultanée de triazophos, de carbofurane et de chlorpyrifos (Guo *et al.* 2013). Dans cette étude, des conjugués haptène-protéines ont été couplés à des microbilles fluorescentes, et l'immunoessai est réalisé en mode compétitif dans les puits de plaques 96-puits de filtration, afin de permettre l'élimination des réactifs en conservant les billes dans les puits. Après évaluation des performances du test avec des échantillons de pesticides, des analyses ont été également réalisées sur des homogénats de légumes complémentés en pesticides. Une sensibilité de l'ordre du µg/L a été obtenue, avec une bonne sélectivité et des valeurs de détermination satisfaisantes.

Enfin, des systèmes d'immunotests multiparamétriques basés sur d'autres supports ont été décrits, avec l'immobilisation des sondes en matrice de plots. Une étude a par exemple été consacrée à la comparaison des performances obtenues avec différents supports pour l'analyse en parallèle de deux pesticides, avec une détection par mesure de fluorescence. Les auteurs se sont intéressés ici à l'optimisation de l'essai, en comparant également la technique de dépôt, de marquage ou encore les tampons utilisés (Belleville *et al.* 2003). Le groupe de Maquieira a utilisé les propriétés d'un support en format « DVD (*digital versatile disk*) » à la fois pour l'immobilisation des molécules sondes, et pour la technologie de détection associée, afin de détecter de l'atrazine, du chlorpyrifos, du sulfathiazole et de la tétracycline. Pour cela, les haptènes ont été conjugués à des protéines, absorbés sur la face de polycarbonate du disque, incubés avec les échantillons en présence des anticorps spécifiques des cibles et enfin avec des anticorps secondaire marqués par des particules d'or. Après amplification du signal grâce à l'utilisation d'une solution d'argent générant des dépôts sur la particule d'or, la mesure des interactions est réalisée grâce à la modification des propriétés de réflectivité de la surface par le produit de réaction, atténuant l'intensité du faisceau laser utilisé pour la lecture. Des limites de détection comprises entre 60 et 370 ng/L ont été atteintes grâce à ce système (Morais *et al.* 2009).

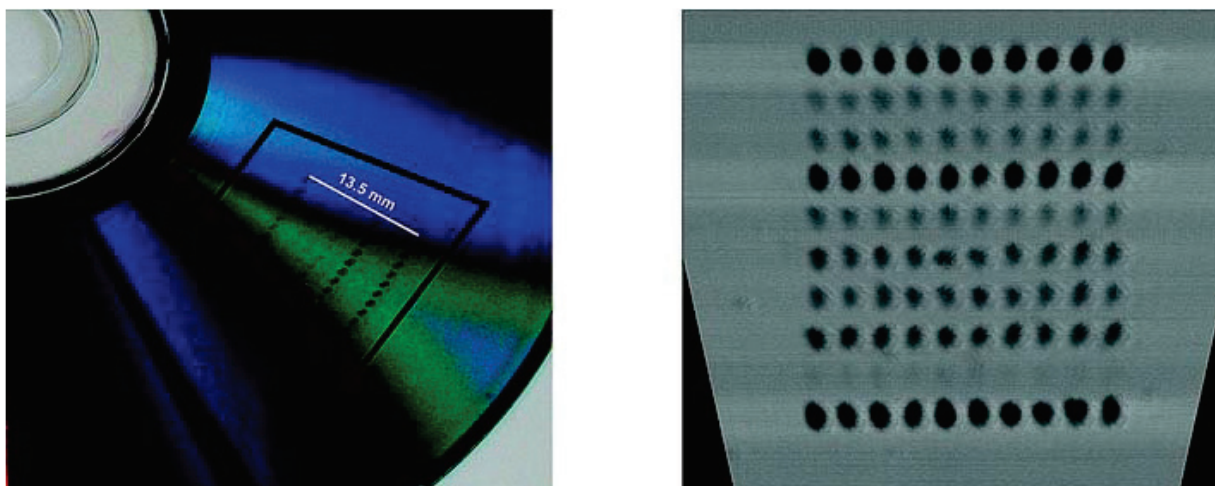


Figure 3-1. Détection colorimétrique de polluants sur un support de format DVD

(Extrait de Morais *et al.* 2009) Un DVD sert ici de support à l'immobilisation des sondes, qui sont adsorbées sur la face en polycarbonate (photographie de gauche). La détection des interactions est réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps secondaires marqués par des particules d'or, modifiant les propriétés de réflectivité de la surface au niveau des différents plots de la matrice (image de droite).

Les inconvénients relatifs à l'utilisation d'anticorps comme base de la reconnaissance de petites molécules telles que les pesticides résident notamment dans les risques de réactivité croisée avec d'autres cibles, généralement structurellement proches. L'évaluation de la réactivité croisée est une étape incontournable dans la mise au point de systèmes de ce type, ainsi que sa minimisation par l'optimisation des différents paramètres expérimentaux. Elle peut par exemple être minimisée par le choix judicieux des haptènes utilisés (Schuetz *et al.* 1999). Néanmoins, certaines études ont démontré l'utilité potentielle de cette réactivité croisée pour la détection de plusieurs polluants à l'aide d'un nombre réduit d'anticorps. Bhand *et al.* ont notamment mis au point un immunotest multiparamétrique à détection colorimétrique pour la détection de deux triazines et quatre acides phénoxyalcanoïques à partir de 3 anticorps (anti-atrazine, anti-simazine et anti-2,4-D) seulement. A l'aide d'une analyse chimiométrique des résultats obtenus pour les trois sondes, les différentes cibles présentes dans l'échantillon ont pu être discriminées et quantifiées (Bhand *et al.* 2005).

1.1.2. AUTRES SYSTEMES

Pour le développement d'outils ne comportant pas d'anticorps comme éléments de reconnaissance, d'autres systèmes ont été mis au point. Très utilisés pour la détection d'un composé cible unique (notamment les capteurs optiques, électrochimiques et mécaniques basés sur des stratégies liées à une activité enzymatique ou à des systèmes de reconnaissance par polymère à empreinte moléculaire), très peu d'études ont pourtant été réalisées pour la détection multiparamétrique de pesticides.

Un système de détection par mesure électrochimique a pu être développé pour l'analyse de composés phénolés (Bebeselea *et al.* 2010). Dans cette étude, deux types d'électrodes ont été comparées pour la détection ampérométrique de nitrophénol et de chlorophénol. Ces composés étant des espèces électroactives, la mesure directe de leur signal électrochimique a permis de les détecter dans des

échantillons d'eau du robinet artificiellement contaminés, avec des valeurs de détermination satisfaisante (R compris entre 92,4 et 96 %).

Une autre approche a été décrite pour la détection de carbaryl et de dichlorvos, reposant sur un système de microbalance à cristal de quartz (Karousos *et al.* 2002). La méthode est basée sur l'effet inhibiteur de ces pesticides sur l'activité de l'acétylcholine estérase. Une cascade de réaction, débutant par la transformation de l'acétylcholine en choline catalysée par l'enzyme, induit en conditions normales et en présence de trois enzymes la production d'un précipité qui s'adsorbe sur le cristal de quartz et provoque la diminution de sa fréquence de résonance. En présence des pesticides cibles, la cascade est inhibée et le cristal ne présente pas la même variation, le signal mesuré est donc modifié. Cette approche a permis la détection de ces cibles, sans pouvoir néanmoins les différencier, avec une sensibilité de 1 µg/L.

1.2. PHYCOTOXINES

Certaines toxines sont produites par des microorganismes marins tels que certaines algues ou coraux, ce sont les phycotoxines. Elles peuvent être assimilées par les crustacés, et par les poissons, et ainsi entrer dans la chaîne alimentaire. Elles sont alors associées à des effets néfastes pour la santé humaine à différents niveaux. Le réseau REPHY (Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) a défini en France, dans le cadre de la réglementation européenne, un objectif de suivi du milieu marin pour différentes espèces de micro-algues productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits de consommation (agriculture.gouv.fr). Trois groupes de toxines sont ciblées, associées à trois types de phytoplancton toxique : les toxines à effet diarrhéiques (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* DSP), telles que les familles de l'acide okadaïque et des azaspiracides, (ii) les toxines de la famille de la saxitoxine (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP), qui sont responsables d'atteintes neurologiques pouvant être mortelles, et (iii) les toxines de la famille de l'acide domoïque (*Amnesic Shellfish Poisoning*, ASP), associées à des intoxications dont les symptômes sont à la fois gastro-intestinaux et neurologiques. Les palytoxines sont également surveillées, majoritairement responsables de difficultés respiratoires et d'irritations cutanées.

1.2.1. SYSTEMES DE DETECTION

Différents outils d'analyse ont été développés pour la surveillance de l'eau au niveau de la présence de ces toxines. Comme précédemment, bien qu'un grand nombre de capteurs ait été mis au point pour la détection d'une seule cible (Fremy *et al.* 1999, Marquette *et al.* 1999, Campàs *et al.* 2007, Humpage *et al.* 2010, Vilariño *et al.* 2010, Hayat *et al.* 2011, Hayat *et al.* 2012, Sassolas *et al.* 2013), peu ont été décrits pour l'analyse de multiples cibles. Très récemment, une étude a par exemple présenté la comparaison entre les approches basées sur des techniques immunochimiques telles que les ELISA ou mesures de SPR, pour le simple criblage de cibles, et celles basées sur des méthodes chromatographiques couplées à des mesures par spectrométrie de masse pour l'identification et la quantification de différents analytes (Krska *et al.* 2012). De la même façon, Humpage *et al.* ont passé en revue des méthodes permettant de détecter des PSP : les méthodes analytiques telles que les chromatographies couplées à la spectrométrie de masse, les bio-essais, basés sur la toxicité de ces composés, et les capteurs utilisant des anticorps ou des systèmes de reconnaissance tels que la

saxiphiline (forte affinité pour les PSP). Cependant, la très grande majorité des articles présentés dans cette revue ne concerne que des systèmes monoparamétriques (Humpage *et al.* 2010). Nous nous intéresserons ici uniquement à ceux dédiés à une analyse multiparamétrique. De plus, bien que d'autres systèmes aient été rapportés pour la détection de toxines provenant d'autres sources comme les mycotoxines (Wang *et al.* 2012c) ou les toxines bactériennes (Shlyapnikov *et al.* 2012), nous ciblerons ici les outils appliqués à la détection de phycotoxines uniquement.

Un immunotest compétitif en format ELISA a été mis au point pour la détection de différentes toxines représentant les différentes familles (DSP, PSP, ASP, NSP (*Neurologic Shellfish Poisoning*)) par l'utilisation des anticorps correspondants dans différents puits d'une micro-plaque. Ce test a démontré des limites de détection compatibles avec les concentrations maximum réglementaires, et ainsi, son potentiel pour le criblage de différentes toxines. De plus, la simplicité du format ELISA permet d'envisager son application à de nombreux polluants (Garthwaite *et al.* 2001). La même approche a également été utilisée par Dubois *et al.* pour la détection d'acide okadaïque, d'acide domoïque et de saxitoxine. Cet essai a permis d'atteindre des limites de détection comprises entre 5 µg/kg et 150 µg/kg, après extraction des cibles de différentes matrices (Dubois *et al.* 2010).

Campbell *et al.* ont quand à eux développé un test permettant la détection de différentes toxines de la famille des PSP, basé sur plusieurs systèmes de reconnaissance immobilisé sur des puces pour l'analyse en SPR (Biacore). Dans cette étude, un récepteur de canal sodique dérivé de cerveau de rat, un anticorps monoclonal produit contre la gonyautoxine et un anticorps polyclonal produit contre la saxitoxine ont été immobilisés à la surface de la puce, et l'immunoessai a été réalisé en format direct et en mode compétitif. Ces systèmes, et en particulier celui basé sur l'anticorps polyclonal, ont permis la détermination de différents profils de réactivité pour plusieurs toxines de la famille des PSP, et leur détection à des concentrations compatibles avec les critères donnés par l'EPA (Campbell *et al.* 2007).

Laycock *et al.* ont également décrit un système d'immunoessai en flux latéral sous forme de bandelette (Figure 3-2), et comparé ses performances à celles obtenues par bio-essai de toxicité sur des animaux modèles, pour la détection de différentes toxines de la famille des PSP. Bien qu'il ne soit pas possible pas de différencier les toxines présentes dans un échantillon, ce test a démontré une bonne sensibilité et des résultats concordant avec ceux obtenus par l'évaluation de la toxicité sur des souris. Il permettrait ainsi de limiter les études sur animaux, qui posent de plus en plus de problèmes d'éthique (Laycock *et al.* 2010).

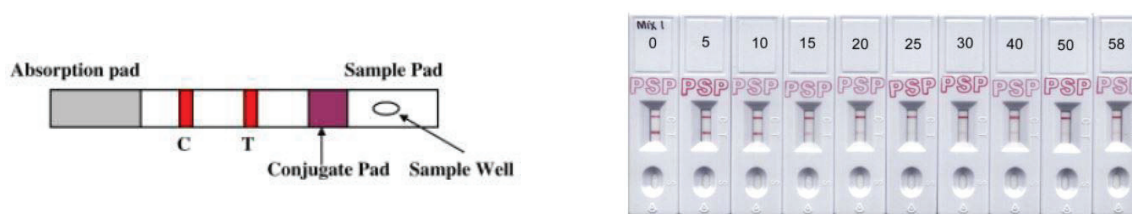


Figure 3-2. Principe d'immunoessai en flux latéral pour la détection de toxines

(Extrait de Laycock *et al.* 2010) Le schéma de gauche présente les différentes parties composant le test sur bandelette : une zone est réservée au dépôt de l'échantillon, qui migre ensuite à travers la zone contenant le conjugué de détection (anticorps marqués par des particules d'or) puis à travers la zone test (T) où des toxines sont immobilisées, et enfin à travers la zone de contrôle positif (C). Les résultats obtenus avec une gamme de concentration de toxines sont présentés sur l'image de droite.

Une étude a présenté récemment la détection d'une spirolide et d'une gymnodimine, grâce à une approche basée sur la compétition de ces toxines avec une autre toxine (marquée par de la biotine) pour le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Le complexe toxine-récepteur est immobilisé sur un support fonctionnalisé par de la streptavidine. En présence de la spirolide ou de la gymnodimine cible, les récepteurs sont relargués du support, et la concentration en récepteur est quantifiée à l'aide d'un anticorps spécifique, marqué par la peroxydase du raifort. Trois techniques de détection ont ici été évaluées, par l'utilisation de trois substrats de l'enzyme : la colorimétrie, la chimiluminescence et la fluorescence. Ces trois approches ont permis d'atteindre une limite de détection de l'ordre de 10 nM, sans pour autant pouvoir différencier les deux cibles (Rodriguez *et al.* 2011), améliorant ainsi la sensibilité de la détection par rapport à un autre essai par fluorescence précédemment mis au point par le même groupe (Vilariño *et al.* 2009).

Différentes approches basées sur l'analyse par puces à oligonucléotides des différents microorganismes présents dans un échantillon d'eau ont été passées en revue assez récemment (Humbert *et al.* 2010). Les études décrites ici s'appuient sur les progrès récents réalisés au niveau du séquençage et les outils de PCR intégrée. Ce type de travaux est cependant très peu appliqué au contrôle environnemental à l'heure actuelle. Enfin, des études de toxicité ont été réalisées sur des modèles cellulaires, présentant une autre approche pour la détection de cibles toxiques dans différents échantillons (Ledreux *et al.* 2012). Ceux-ci ne sont cependant pas adaptés pour l'instant à une analyse sur site.

1.3. EXPLOSIFS

Les explosifs représentent le troisième type de cibles. Ils sont classés en plusieurs groupes, selon leur vitesse d'explosion puis selon leur mode d'action (initiateurs ou détonateurs). Ils sont divisés en six classes de composés chimiques. La majorité des explosifs utilisés pour des objectifs militaires sont des composés organiques contenant un groupement nitro (NO₂). Les trois classes les plus représentées sont les composés nitro-aromatiques (le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) par exemple), les nitramines (telles que le cyclotriméthylènetrinitramine (RDX)), et les esters de nitrate (comme la nitroglycérine (NG)). On retrouve également les composés nitro-aliphatiques (nitrométhane), les peroxydes (triacétone triperoxyde (TATP)) et les sels d'acide (nitrate d'ammonium) (Singh 2007).

La première menace que constituent les explosifs est liée à leur utilisation pour la fabrication d'engins explosifs improvisés (IED, *improvised explosive device*), et à leur potentiel dans la réalisation d'actes terroristes. Ils constituent donc une menace pour la sécurité des citoyens par ce biais. Cependant, ce n'est pas la seule raison qui en fait d'importantes cibles dans le contrôle de l'eau. En effet, au-delà de la menace qu'ils représentent au niveau de la fabrication de bombes, ces composés ont également des propriétés toxiques. Leur rejet dans l'environnement peut provenir de sites militaires et de fabrication de munitions, ainsi que des activités terroristes. Une caractéristique importante des composés nitro-aromatiques réside dans leur capacité à pénétrer la barrière épidermique. Ils sont alors responsables de la formation de méthémoglobine, pouvant conduire à l'hypoxie des tissus, et d'anémie en cas d'exposition chronique. Le TNT peut par exemple entrer dans les eaux souterraines, et a été classé comme toxique à des concentrations supérieures à 2 µg/L par l'Agence pour la Protection de l'Environnement des Etats Unis. Il présente des effets néfastes pour les poissons, les algues et les

microorganismes, ainsi que pour la santé humaine. Cet explosif peut en effet causer des dommages au foie, des anémies, des hépatites toxiques, ou encore des douleurs musculaires, des irrégularités des pulsations cardiaques, des irritations des reins et des tumeurs de la vessie. Le TNT comme le RDX ont été décrits comme de possibles carcinogènes (EPA 1988, EPA 1989, Levine *et al.* 1990).

Du fait de ces problématiques, il apparaît nécessaire de réaliser le contrôle de la présence de ce type de polluant dans l'eau, pour des questions de santé publique mais également afin de localiser de potentielles activités terroristes. Différents types de systèmes sont déjà mis en place, pour la détection de vapeurs d'explosifs notamment. L'approche la plus mise en œuvre à l'heure actuelle consiste à utiliser des chiens entraînés comme cela est fait pour d'autres substances illicites. Cependant, cette approche génère des coûts élevés pour entraîner le chien, nécessite une personne formée pour le guider, et ces chiens ne peuvent pas être utilisés en permanence et sont sujets à des variations de comportement pouvant nuire à leur précision. D'autres approches ont été décrites pour répondre à la demande de nouveaux outils fiables, rapides, sensibles et à faible coût dédiés à la détection d'explosifs. Comme pour les autres polluants, la majeure partie des systèmes développés permettent des analyses monoparamétriques (Singh 2007, Smith *et al.* 2008, Burks and Hage 2009, Caygill *et al.* 2012, Li *et al.* 2013, Yu *et al.* 2013b). Ceux adaptés à la détection de multiples explosifs cibles dans l'eau (nous ne nous intéresserons pas ici à ceux dédiés aux analyses dans l'air) sont passés en revue dans les paragraphes suivants.

1.3.1. SYSTEMES DE DETECTION BASES SUR DES IMMUNOTESTS

En 1993, un système d'immunotest en flux a été développé par le groupe de Ligler pour la détection monoparamétrique de TNT (Whelan *et al.* 1993). Ce système a ensuite été amélioré pour la détection de RDX et de TNT en simultané, il fait alors l'objet d'un test de l'EPA pour les outils de contrôle de la présence d'explosifs (Bart *et al.* 1997). En 2000, le même groupe modifie le format du test de façon à optimiser ses performances (Rabbany *et al.* 2000). Ce système est basé sur l'immobilisation d'anticorps anti-TNT et anti-RDX sur des membranes poreuses placées dans des colonnes permettant le passage du flux d'échantillon. Les sites de fixation des anticorps sont tout d'abord saturés avec des antigènes marqués par des fluorophores, et le passage d'échantillon contenant les analytes induit la libération des antigènes marqués. La fluorescence est alors mesurée en aval de la réaction, et est reliée à la concentration des analytes dans l'échantillon. Une bonne sensibilité a été ainsi obtenue, rendant possible la détection de ces analytes en solution à des concentrations de 1 µg/L. Un autre système basé sur un immunotest à mesure de fluorescence a été développé par le même groupe cette même année. Celui-ci, fabriqué avec un support de fibre optique, a permis la détection de RDX et de TNT à des concentrations de 5 µg/L (van Bergen *et al.* 2000). En 2003, Shriver-Lake *et al.* ont passé en revue différents systèmes commercialisés pour la détection de RDX et de TNT, et des immunotests en flux continu développés par ce groupe, basés sur l'utilisation de différents formats pour l'immobilisation des anticorps : des microbilles, des membranes, et des micro-capillaires, démontrant tous de bonnes performances en termes de sensibilité (Shriver-Lake *et al.* 2003).

L'équipe de Girotti s'est également intéressée à la détection d'explosifs par immunotests. Dans un premier temps, deux tests ont été développés, l'un basé sur un ELISA classique par compétition, et

l'autre en format bandelette avec marquage des anticorps par des particules d'or générant un signal colorimétrique a été décrit pour la détection de TNT (Girotti *et al.* 2010). Ensuite, un système en microplaque a été adapté à la détection de TATP et HMTD en simultané, basée sur la décomposition de ces deux composés en peroxyde d'hydrogène, lui-même détecté par la réaction de chimiluminescence du luminol dont il est l'un des substrats. Ce système a permis la détection de TATP et HMTD de manière spécifique, sans toutefois permettre de les distinguer entre eux (Girotti *et al.* 2011). Un système basé sur la même approche a été développé pour la détection de RDX et d'autres nitramines, utilisant ces composés pour générer une réaction de chimiluminescence du $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$. Dans cette étude, une analyse en flux a été utilisée, sans système de reconnaissance par des anticorps mais en injectant les réactifs nécessaires à la réaction de chimiluminescence (Donaldson *et al.* 2012). Les capteurs fondés sur cette approche de mesure de chimiluminescence liée à la présence de composés azotés tels que les nitramines avait déjà été passés en revue en 2004 (Jimenez and Navas 2004).

1.3.2. SYSTEMES DE DETECTION ELECTROCHIMIQUE

La majorité des explosifs, et en particulier les composés nitro-aromatiques, présentent des propriétés redox. De ce fait, ces molécules électroactives présentent un signal spécifique en électrochimie qui permet non seulement leur détection mais également leur identification et leur quantification. Plusieurs types de systèmes ont été décrits, mettant en jeu la mesure d'un signal électrochimique, souvent combinée à une analyse chimiométrique.

Une puce pour la détection de TNT, RDX et HMX et dix composés proches (Hilmi *et al.* 1999) puis de TNT, RDX ainsi que de 2,3- 2,4- et 2,6-dinitrotoluène (Hilmi and Luong 2000) a été mise au point, combinant un système de micro-électrophorèse capillaire avec une mesure par ampérométrie. Pour permettre une détection électrochimique après séparation des analytes par électrophorèse, une électrode de mesure a été placée à la sortie du canal de séparation. Cet outil d'analyse à bas coût a alors permis l'identification des différentes cibles et la détermination de leur concentration, avec des limites de détection de l'ordre de 100 à 200 $\mu\text{g/L}$. Un autre groupe a également développé un système basé sur le même principe. Dans ce cas, l'électrophorèse est réalisée dans un premier temps pour cribler la présence de toutes les cibles confondues, puis l'utilisation d'un autre tampon de migration permet de séparer les analytes, qui sont ensuite identifiés par comparaison avec une signature électrochimique prédéfinie. Des limites de détection de l'ordre de 60 $\mu\text{g/L}$ ont été atteintes pour la détection de TNT et de DNT avec ce système (Wang *et al.* 2002).

Un outil simple, et peu coûteux, basé uniquement sur un système d'électrodes sérigraphiées a été mis en œuvre pour la détection de différents polluants, dont le TNT. Pour cette approche, le dépôt d'une goutte de 20 μL d'échantillon permet d'en effectuer l'analyse, par mesure en voltammétrie à ondes carrées (Square wave voltammetry). Un standard interne est utilisé afin de produire un pic à un potentiel défini, et la présence des différents composés nitro-aromatiques induit le déplacement de ce pic, à un potentiel associé au composé présent dans l'échantillon. Des limites de détection de l'ordre de 42 μM ont été ainsi obtenues (Chen *et al.* 2006).

Un autre capteur électrochimique, basé sur une mesure d'impédance, a été mis au point pour la détection d'explosifs. Les composés cibles, en s'adsorbant sur la surface de l'électrode, modifient le signal obtenu lors de la mesure. Les signaux obtenus en présence des différents composés sont analysés par une méthode chimiométrique, en composantes principales (PCA). Cette analyse statistique a rendu envisageable l'identification des explosifs. La discrimination des composés pour les faibles concentrations (inférieures au mM) étant délicate avec l'utilisation d'une électrode de platine non modifiée, la surface de l'électrode a été modifiée par de l'anthracène, afin d'améliorer la sensibilité et la sélectivité du système (Masunaga *et al.* 2005). Des analyses chimiométriques ont souvent démontré leur utilité pour la discrimination des signaux électrochimiques obtenus par la mesure de différents composés. Polsky *et al.* ont par exemple utilisé une approche de ce type pour la détection de TNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT et 2-NT à l'aide de mesures sur des électrodes de carbone vitreux dont la surface a été modifiée (Polsky *et al.* 2009).

1.3.3. AUTRES SYSTEMES

D'autres systèmes ont été décrits pour leur potentiel pour la détection d'explosifs, bien que moins représentés. L'utilisation de polymères fluorescents a par exemple été présentée comme une approche très attractive, du fait de leur sensibilité inhérente pour les explosifs. Cette propriété résulte de la nature fortement électro-attractrice du TNT et des autres composés explosifs, couplée au type de détection basée sur des polymères fluorescents. Le mécanisme de transduction repose sur une réaction de transfert d'électron entre un électron à l'état excité du polymère et un composé électro-attractif tel que le TNT, induisant une atténuation de fluorescence du polymère. Cette approche a été utilisée par Woodka *et al.*, combinée à une analyse par des méthodes chimiométriques des signaux de fluorescence (figure X). Le système développé ici a permis la discrimination de TNT, de tetryl et d'autres composés proches, à l'exception du RDX dont les résultats ont été classés avec ceux des contrôles négatifs (Woodka *et al.* 2010).

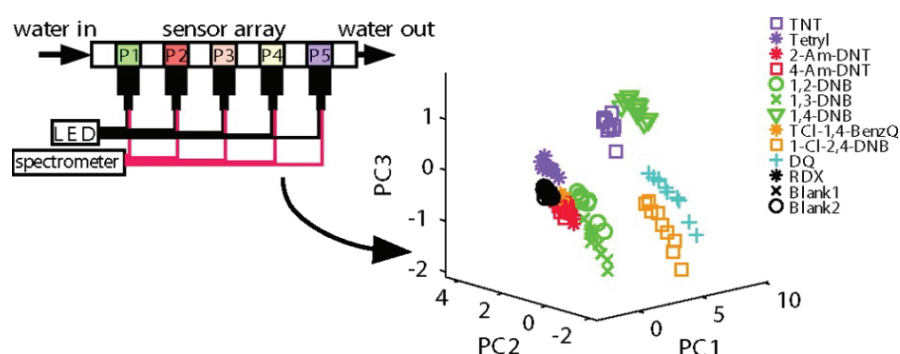


Figure 3-3. Schéma de principe de la détection multiparamétrique d'explosifs par mesure de fluorescence, analysées par PCA

(Extrait de Woodka *et al.* 2010) L'échantillon est mis en présence de différents polymères fluorescents, dont le signal est alors mesuré. L'analyse des résultats par une méthode chimiométrique permet alors de discriminer les composés présents dans l'échantillon

Enfin, l'utilisation de microleviers a également été envisagée pour la détection d'explosifs. Un système basé sur un format DVD et composé d'un grand nombre de microleviers pouvant être modifiés indépendamment a été récemment développé par le groupe de Boisen, rendant possible la détection multiparamétrique de cibles en phase liquide ou gazeuse. Pour la détection d'explosifs, les microleviers ont été modifiés par des molécules réceptrices mises au point pour fixer des composés nitro-aromatiques tels que le TNT, le TNB ou encore le DNT (Bosco *et al.* 2012).

Parmi les différents systèmes décrits, assez peu ont été appliqués à la détection de plusieurs classes de polluants. On peut néanmoins citer l'exemple de l'immunotest en format DVD de Morais *et al.*, permettant la détection de pesticides et d'antibiotiques (Morais *et al.* 2009), le fluoro-immunoessai multiparamétrique sur guide d'onde de Ligler *et al.* pour la détection de toxines et d'explosifs (Ligler *et al.* 2003), ou encore l'immunotest à détection chimiluminescente du groupe de Niessner pour la détection de différents types de polluants (dont un pesticide et un explosif) en parallèle (Weller *et al.* 1999).

2. DETECTION DE PRECURSEURS D'EXPLOSIFS POUR LE CONTROLE ANTI-TERRORISTE

Les engins explosifs improvisés (IED, *improvised explosive devices*) sont des bombes fabriquées de manière artisanale, généralement en vue d'une utilisation pour un acte terroriste. Ce type d'engin a notamment été utilisé lors des attentats de Madrid (2004), de Londres (2005), d'Oslo (2011) ou de Boston (2013). Des instructions pratiques pour fabriquer ces bombes circulent dans le monde entier par l'intermédiaire d'internet. Les précurseurs nécessaires sont facilement accessibles dans les magasins de détail ou en ligne, souvent à un prix modéré et dans les concentrations élevées qui sont nécessaires pour des explosifs de fabrication artisanale, ainsi que pour des utilisations finales légitimes de nature industrielle ou domestique. Par exemple, le nitrate d'ammonium est commercialisé à des concentrations élevées en tant qu'engrais pour l'agriculture. Son utilisation peut être détournée pour la fabrication de bombes artisanales, du fait de ses propriétés explosives. Il existe différents précurseurs, utilisés dans la synthèse d'explosifs tels que ceux décrits précédemment, et pour la fabrication d'engins explosifs.

2.1. PRECURSEURS UTILISES POUR LA SYNTHESE D'EXPLOSIFS ET LA FABRICATION DE BOMBES ARTISANALES

Les explosifs peuvent être synthétisés avec des précurseurs facilement accessibles : le TATP peut être préparé avec de l'acétone, du peroxyde d'hydrogène et un acide fort, le RDX avec de l'hexamine et de l'acide nitrique, le HMTD avec du peroxyde d'hydrogène, de l'hexamine et un acide faible (acide citrique par exemple), enfin, le TNT est préparé à base de toluène et d'acide nitrique.

La Commission Européenne, dans le document du 15 janvier 2013 relatif à la commercialisation et à l'utilisation de précurseurs d'explosifs, a déterminé une liste de composés correspondants à des précurseurs d'explosifs devant être interdit à la vente aux particuliers sous forme concentrée, tels quels ou dans des mélanges les contenant, de façon à limiter les possibilités de fabrication de bombe artisanale. Les composés ont été classés selon deux catégories : les substances qui ne doivent pas se trouver dans le commerce, et les substances pour lesquelles des transactions suspectes doivent être rapportées aux autorités compétentes.

La première catégorie comprend le peroxyde d'hydrogène, le nitrométhane, l'acide nitrique, le chlorate et perchlorate de potassium, le chlorate et perchlorate de sodium, ainsi que le nitrate d'ammonium. Les composés de la seconde catégorie sont l'hexamine, l'acide sulfurique, l'acétone, le nitrate de potassium, de sodium et de calcium, et le nitrate d'ammonium de calcium. On peut donc comprendre que ces composés sont considérés comme prioritaires dans la lutte contre le terrorisme, et que leur utilisation doit être contrôlée.

Dans ce cadre, des systèmes permettant la détection de ces molécules doivent être développés, afin d'être mis en œuvre avec les systèmes de détection d'explosifs. Pour faire face à cette demande, la recherche scientifique s'est intéressée à la mise au point de nouveaux capteurs, et plusieurs projets de recherche européens pour la sécurité ont notamment vu le jour.

2.2. SYSTEMES DE DETECTION DE PRECURSEURS D'EXPLOSIFS DANS L'EAU

De très nombreux systèmes ont déjà été décrits pour la détection de certains précurseurs d'explosifs, comme le peroxyde d'hydrogène par exemple, du fait de ses applications dans un grand nombre de mécanismes. Les capteurs dédiés à la détection du peroxyde d'hydrogène sont principalement basés sur des mesures de chimiluminescence (en tant que substrat de la peroxydase du raifort) et d'électrochimie, mais également sur des systèmes de microleviers fonctionnalisés. La détection de nitrate d'ammonium est moins courante, et est réalisée presque exclusivement par des analyses par spectrométrie de masse. Des outils dédiés à la détection d'acétone ont été mis au point, souvent basé sur l'utilisation de capteurs purement chimiques. De plus, très peu de publications concernent les systèmes de détection du nitrométhane, du perchlorate et chlorate de sodium et de potassium ou de l'acide nitrique.

Du fait de la potentielle utilisation de ces composés dans un autre contexte que la fabrication d'explosifs (l'acétone est un solvant très utilisé dans l'industrie et les laboratoires, mais aussi dans les dissolvants de vernis à ongles, le nitrate d'ammonium dans l'agriculture, le peroxyde d'hydrogène dans les désinfectants ou les produits de décoloration etc.). Ces composés doivent être détectés de façon concomitante afin de démontrer une potentielle utilisation à des fins de fabrication de bombe. A l'heure actuelle, la littérature ne présente, à notre connaissance, aucune publication concernant la détection multiparamétrique de précurseurs d'explosifs dans l'eau.

3. LE PROJET EUROPEEN BONAS

Le projet BONAS, *Bomb factory detection by Network of Advanced Sensors* - détection de fabrique de bombe à l'aide d'un réseau de capteurs, a pour but la mise au point et la mise en réseau de différents systèmes de détection d'explosifs et de leurs précurseurs. Certains des systèmes seront destinés à l'analyse de ces composés à l'état gazeux autour des zones suspectes, et les autres à l'analyse des composés potentiellement retrouvés dans les eaux usées venant des zones suspectes.

Les principaux objectifs de ce projet ont été précisément définis. Ils consistent à

- imaginer, mettre au point et tester un nouveau réseau sans fil de capteurs pour améliorer la protection des citoyens et la sécurité des nations contre des menaces telles que les attaques terroristes, et en particulier contre celles dues aux IED. Le réseau de capteurs visera à la détection de traces de précurseurs utilisés dans la production d'IED, sous la forme de particules, de gaz ou de rejets dans l'eau, présent dans l'environnement entourant une « fabrique de bombe artisanale » suspectée. Ce point permettra de contribuer à la localisation de ces fabriques de bombe, donnant la possibilité de réagir précocement contre la menace.
- réaliser une étude de faisabilité mettant en avant l'utilité et les avantages que le concept de BONAS peut présenter dans le futur. Une analyse des coûts sera également effectuée, dans le but de déterminer l'effort financier associé au déploiement du réseau ainsi qu'à son utilisation et à sa maintenance.
- démontrer le concept de BONAS dans un scénario proche de celui effectivement retrouvé dans ce contexte, en mettant en place le réseau de capteur dans le but d'évaluer ses performances et son potentiel d'application à plus large échelle.
- définir et préparer le potentiel de déploiement de certains des capteurs sur une plateforme volante, avec comme perspective l'amélioration des capacités de détection du réseau BONAS.

Notre participation à ce projet consiste dans le développement de deux types de capteurs dédiés à l'analyse de l'eau. L'un sera destiné à la détection multiparamétrique d'explosifs par immunotest, et le second à la détection des précurseurs définis comme étant des cibles prioritaires par mesure électrochimique.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 4. Matériel et Méthodes

1. MATERIELS

1.1. REACTIFS

1.1.1. SONDAS ET CIBLES

1.1.1.1. ALLERGENES

Protéines recombinantes allergènes de cerise :

rPru a4 : 0,42 mg/mL.....Dr. Stephan Scheurer, Paul Ehrlich Institute, Allemagne

rPru a1 : 1,59 mg/mL..... Idem

rPru a3 : 1,86 mg/mL..... Idem

Protéines recombinantes allergènes de pomme :

rMald1 : 0,11 mg/mL..... Idem

rMal d3 : 0,99 mg/mL..... Idem

rMal d4 : 1,15 mg/mL..... Idem

Protéine recombinante allergène de noisette :

rCor a1 : 0,48 mg/mL..... Idem

Protéine recombinante allergène de pollen de bouleau :

rBet v1 : 0,82 mg/mL..... Idem

Extraits de pomme : 18 µg/mL..... Idem

Extrait de cerise : 419 µg/mL..... Idem

1.1.1.2. ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS (TAA)

Facteur du Complément H (CFH) (100 µg/100 µL) Sigma-Aldrich

Cycline B1 (10 µg/100 µL)..... Santa Cruz Biotechnology

Cycline D1 (10 µg/100 µL) Santa Cruz Biotechnology

c-Myc (25 µg)..... Proscience

c-Myc (50 µg/50 µL) Santa Cruz Biotechnology

Her2/neu (20 µg) Alpha diagnostic International

IMP1 (25 µg) Proscience

IMP3 (10 µg) Abnova

p53 (25 µg) Proscience

p62 (25 µg) Proscience

NY-ESO-1 (10 µg/100 µL) Spring Bioscience

Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) (100 µg) EXBIO

Survivine (100 µg)..... Alpha diagnostic International

Survivine (25 µg)..... Proscience

1.1.1.3. POLLUANTS, EXPLOSIFS, TOXINES ET DERIVES

1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine (RDX).....	LGC Standards
2,4,6-trinitrotoluène (TNT).....	LGC Standards
2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (atrazine)	Sigma-Aldrich
Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T)	Sigma-Aldrich
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)	Sigma-Aldrich
Acide 4-benzoylbenzoïque (4-BBA)	Sigma-Aldrich
Acide okadaïque (<i>Prorocentrum concavum</i>)(OA).....	Sigma-Aldrich
Acide picrylsulfonique (TNBS)	Sigma-Aldrich
Atrazine-BSA.....	Euromedex
RDX-Dextran	Prof. Stephano Girotti
RDX-Ovalbumine (OVA-RDX)	Prof. Stephano Girotti

1.1.1.4. PRECURSEURS D'EXPLOSIFS

Hexaméthylènetetramine (hexamine)	Sigma-Aldrich
Hypochlorite de sodium (NaOCl).....	Sigma-Aldrich
Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃).....	Sigma-Aldrich
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	Prolabo

1.1.1.5. ECHANTILLONS TESTS

Sérums de patients allergiques	Dr. Stephan Scheurer, Paul Ehrlich Institute, Allemagne
Sérums de patients atteints de cancer	Etablissement Français du Sang
Sérums de patients sains.....	Etablissement Français du Sang

1.1.2. ANTICORPS

1.1.2.1. ANTI-TAA

Anti-CFH (IgG polyclonaux développés chez le lapin 9,2 mg/mL).....	Sigma-Aldrich
Anti-cyclin B1 (IgG polyclonaux développés chez le lapin 5,4 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Anti-cyclin D1 (IgG polyclonaux développés chez le lapin 10 mg/mL).....	Sigma-Aldrich
Anti-c-myc (IgG polyclonaux développés chez le lapin 0,5 mg/mL).....	Sigma-Aldrich
Anti-Her2/neu (IgG monoclonaux clone 4B8 développés chez la souris 0,5 mg/mL).....	Sigma-Aldrich
Anti-IMP1 (IgG polyclonaux développés chez le lapin 1 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Anti-NY-ESO-1 (IgG monoclonaux clone E978 développés chez la souris 1,3 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Anti-p53 (IgG monoclonaux clone DO-7 développés chez la souris 2,1 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Anti-p62 (IgG polyclonaux développés chez le lapin 1,3 mg/mL)	Sigma-Aldrich
Anti-survivine (IgG polyclonaux développés chez le lapin 8,2 mg/mL).....	Sigma-Aldrich

1.1.2.2. ANTI-POLLUANTS

Anti-2,4-D (IgG monoclonaux clone E2G2 développés chez la souris 1 mg/mL)Dr. Milan Franek
 Anti-atrazine (IgG monoclonaux clone 6F36 développés chez la souris 1 mg/mL) Euromedex
 Anti-RDX (IgG monoclonaux développés chez la souris 5 mg/mL) Strategic Diagnostics
 Anti-TNT (IgG monoclonaux clone A1 développés chez la souris 10,9 mg/mL)..... Strategic Diagnostics
 Anti-OA (IgG monoclonaux clone 7E1 développés chez la souris 1 mg/mL).... Santa Cruz Biotechnology

1.1.2.3. ANTICORPS SECONDAIRES

Anticorps polyclonaux conjugués à la phosphatase alcaline :

Anti-IgE humain (développés chez la souris 1 mg/mL) Sigma-Aldrich
 Anti-IgG lapin (développés chez la chèvre 0,6 mg/mL).....Jackson Immuno-Research
 Anti-IgG souris (H+L) (développés chez la chèvre 0,6 mg/mL).....Jackson Immuno-Research
 Anti-IgG humain (développés chez la chèvre 0,6 mg/mL)Jackson Immuno-Research
 Anti-IgG souris (Fc spécifique) (développés chez la chèvre 1,3 mg/mL)..... Sigma-Aldrich

Anticorps polyclonaux conjugués à la peroxydase de raifort :

Anti-IgG souris (développés chez la chèvre 1 mg/mL)Calbiochem

1.1.3. AUTRES REACTIFS

1.1.3.1. PRODUITS CHIMIQUES ET SOLVANTS

Acétate de palladium ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$)..... Sigma-Aldrich
 Acide Ascorbique Sigma-Aldrich
 Acide hydrochlorique (HCl) Prolabo
 Acide Chloroplatinique hexahydrate (H_2PtCl_6)..... Sigma-Aldrich
 Acide tétrachloroaurique (HAuCl_4)..... Sigma-Aldrich
 Albumine de sérum bovin (BSA)..... Sigma-Aldrich
 Aminophénol Sigma-Aldrich
 4-aminophényl phosphate DropSens
 Bleu de bromophénol..... Sigma-Aldrich
 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Bleu de nitrotétrazolium (BCIP/NBT) Sigma-Aldrich
 N-N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) Sigma-Aldrich
 1,6-Diaminohexane Sigma-Aldrich
 Diéthylmalonyurée sodée (Véronal) Prolabo
 1,4-Dioxane Sigma-Aldrich
 Encre de carbone, Electrodag® 423 SS Acheson
 Encre de polymère isolant, Minico® M 7000 Blue Acheson
 LowCross Buffer..... Candor Bioscience GmbH
 Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)..... Sigma-Aldrich
 N-hydroxysuccinimide (NHS)..... Sigma-Aldrich

Nitrophénol	Sigma-Aldrich
4-Nitrophényl phosphate	Sigma-Aldrich
Para-iodophénol	Sigma-Aldrich
Peroxyde d'hydrogène 30% (H ₂ O ₂)	Prolabo
Phénol.....	Sigma-Aldrich
Phénylphosphate.....	Sigma-Aldrich
Polyoxyéthylènesorbitan monolauréate (tween 20)	Sigma-Aldrich
Solution de réactif pour dosage protéique	Bio-rad
Sylgard 184 Base.....	Dow Corning
Sylgard 184 Agent de séchage.....	Dow Corning

1.1.3.2. TAMPONS

Tampon de couplage des sondes

Tampon Carbonate 100 mM pH = 9

Tampon de dépôt des sondes

Tampon Acétate 100 mM ; KCl 100 mM ; pH = 5,5 ; bleu de bromophénol 0,25 mg/mL

PBS (Phosphate Buffer Saline)

Tampon phosphate 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4

PBS-TA (Phosphate Buffer Saline Tween Albumin)

Tampon phosphate 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4 ou 8,5 ; Tween 1‰ (v/v) ; BSA à 1% (m/v)

VBS (Veronal Buffer Saline)

Tampon véronal 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4 ou 8,5

VBS-TA (Veronal Buffer Saline Tween Albumin)

Tampon véronal 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4 ou 8,5 ; Tween 1‰ (v/v) ; BSA à 1% (m/v)

Tampon de saturation « LowCross »

Tampon phosphate 100 mM ; NaCl 100 mM ; pH = 7,4 ; LowCross-Buffer 20% (v/v)

Tampon de révélation par colorimétrie

Solution de 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate / bleu de nitrotétrazolium prête à l'emploi

Tampon de révélation par chimiluminescence

VBS (pH = 8,5) ; Luminol 220 µmol/L ; p-iodophénol 220 µmol/L ; H₂O₂ 500 µmol/L

Tampon de mesure électrochimique en présence de phosphatase alcaline

Tris 50 mM ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 1 mM ; ZnCl₂ 0,1 mM ; pH = 9

1.2. SUPPORTS

Adhésif sensible à la pression, TKL	Axo Science
Adhésif double face	3M
Billes de latex, Polybead Amino (1,00 µm)	Polyscience
Bille de latex, Polybead Carbonate (1,00 µm)	Polyscience
Dextran Amino (500 000 Da)	Life Technologies
Feuilles de polycarbonate, Lexan 80330	ThyssenKrupp Cadillac Plastic
Papier absorbant avec une face en polyéthylène « Benchkote »	Whatman
Plaques 96 puits ELISA, MaxiSorp à fond plat, blanches	Nunc MaxiSorp
Plaques 96 puits fond cellulose/acétate de cellulose, Multiscreen HTS-HA, blanches	Millipore
Plaques 96 puits sans fond, noires	Greiner Bio-one
Plaque 96 ½ puits, transparentes	Greiner Bio-one

1.3. INSTRUMENTS

Appareil de dépôt non-contact Biochip Arrayer BCA1	Perkin-Elmer
Appareil de dépôt non-contact SciFlex Arrayer S3	Scienion
Appareil de sérigraphie DEK 248	Dek International
Automate de pipetage EVO75	TECAN
Colonne Sephadex™ G-25 M	Amersham Biosciences
Enceinte thermostatée ThermoMixer™	Eppendorf
Enregistreur graphique Servotrace	Sefram
Lecteur de plaque multi-mode Infinite M200	TECAN
Luminomètre lecteur de plaque Luminoscope	Labsystems
Microfiltres Microcon YM-30	Millipore
Microscope Optique	Zeiss
Multi-potentio-stat VMP3	Bio-Logic
Pompe péristaltique avec lecteur UV Single Path Monitor	Pharmacia Fine Chemicals
Profilomètre NJ Optimal	NanoJura
Scanner de bureau Scanjet 3770	Hewlett-Packard
Silhouette™SD craft cutter	QuickKutz

1.4. LOGICIELS

DEK Align 4	Dek International
EC-Lab 9.46	Bio-logic
Evoware	Tecan
GenePix Pro 5.0	Axon Instrument
Image Gauge 4.0	Fujifilm
Luminoscope Acent 2.4	Labsystems
MountainMap	Digital Surf

2. METHODES

2.1. PREPARATION DES SONDES

2.1.1. PREPARATION DES SONDES PROTEIQUES

Les protéines sondes (allergènes et antigènes associés aux tumeurs) ont été utilisées telles que reçues, sans préparation préalable.

2.1.2. COUPLAGE DES PETITES MOLECULES

Dans le but d'intégrer en biopuce les petites molécules sondes (environ 300 g/mol pour les explosifs et pesticides, et 800 g/mol pour les toxines), celles-ci ont été conjuguées à différents « porteurs ». L'albumine de sérum bovin, ainsi que des billes de latex ou du dextran modifié ont été utilisés.

2.1.2.1. ACTIVATION DES PETITES MOLECULES

Les petites molécules sondes (2,4-D ; 4-BBA ; 2,4,5-T ; TNT ; OA) ont été greffées sur de la BSA, des billes de latex-amino et du dextran-amino. Pour ce faire, les petites molécules ont été activées au niveau de leur fonction acide carboxylique par la méthode du carbodiimide (Figure 4-1). Ces molécules sont incubées à une concentration de 1,36 mg/mL dans une solution de dioxane en présence de 3,9 mg/mL de N-hydroxysuccinimide et de 14,28 mg/mL de N,N'-dicyclohexyl carbodiimide à température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 10 000 rpm afin d'éliminer le précipité de dicyclohexylurée formé lors de l'activation.

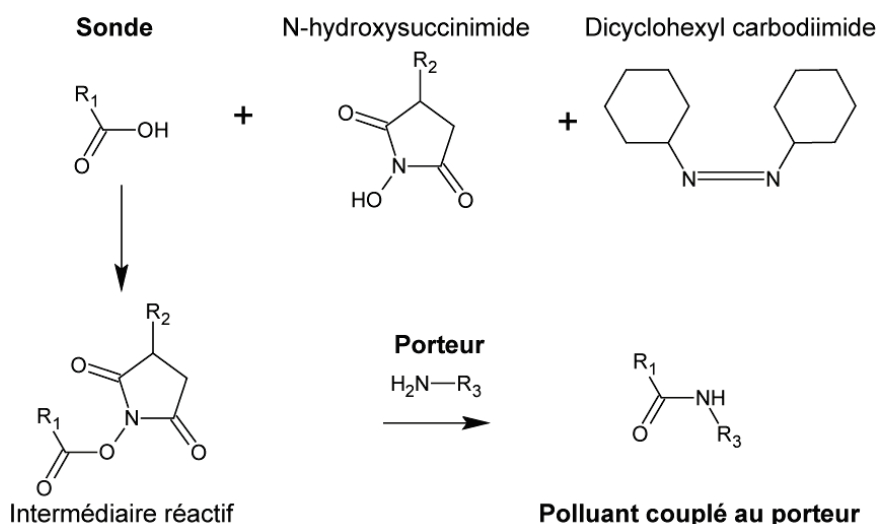


Figure 4-1. Couplage des molécules sondes à des porteurs

Lors de la première étape, les petites molécules sont activées par du NHS en présence de DCC pour former un intermédiaire réactif. La mise en présence du porteur permet alors la génération d'une liaison amide entre le COOH activé de la petite molécule et les groupements NH_2 du porteur

2.1.2.2. GREFFAGE SUR BSA

Les petites molécules activées sont alors greffées sur la BSA par couplage entre la fonction acide carboxylique activée avec les fonctions amines primaires de la protéine, comme illustré dans la seconde partie de la Figure 4-1. 20 μ L de surnageant d'activation sont ajoutés sous agitation à 500 μ L d'une solution de BSA à une concentration de 10 mg/mL dans du tampon carbonate 0,1 M, pH 11. Le mélange est agité deux heures à température ambiante. Les conjugués petite molécule-BSA sont ensuite séparés des composés n'ayant pas réagi sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25. Du tampon carbonate 0,1 M, pH 9 est alors utilisé comme tampon d'élution. Le passage sur colonne se fait grâce à une pompe péristaltique et l'élution est suivie par lecture spectrométrique UV à 280 nm, associée à un enregistreur graphique. Le premier pic obtenu correspond à la fraction d'intérêt, contenant le conjugué. Le second pic enregistré témoigne du passage des molécules non couplées. La concentration en protéine dans la fraction contenant le conjugué est alors dosée (selon la méthode présentée dans le paragraphe 2.2.1) puis la fraction est stockée telle quelle à 4°C avant préparation des solutions de dépôt.

2.1.2.3. GREFFAGE SUR UNE BILLE DE LATEX

Les petites molécules activées sont aussi greffées sur des billes de polymère de latex-amino. 20 μ L de surnageant d'activation sont ajoutés à 250 μ L d'une solution de billes de latex amino dans du tampon carbonate 0,1 M, pH 11. Le mélange est alors agité deux heures à température ambiante. Les conjugués latex sont ensuite séparés des molécules n'ayant pas réagi à l'aide de 3 cycles de centrifugation/rinçage successifs sur colonne Microcon 3000. Ils sont alors stockés dans un tampon Acétate 0,1 M, KCl 0,1 M de pH = 5,5 à 4°C avant préparation des solutions de dépôt.

2.1.2.4. GREFFAGE SUR UN POLYMERE DE DEXTRAN

Les petites molécules activées sont aussi greffées sur des polymères de dextran-amino. 20 μ L de surnageant d'activation sont ajoutés à 250 μ L d'une solution de dextran-amino, dans du tampon carbonate 0,1 M, pH 11. Le mélange est agité deux heures à température ambiante. 3 cycles de centrifugation/rinçage successifs sur colonne Microcon 3000 permettent de séparer les conjugués dextran des molécules n'ayant pas réagi. Ils sont alors stockés dans un tampon Acétate 0,1 M, KCl 0,1M, pH 5,5 à 4°C avant préparation des solutions de dépôt.

2.2. CARACTERISATION DES CONJUGUES

2.2.1. METHODE DE BRADFORD

La quantité de protéine est dosée dans la fraction contenant les conjugués BSA-petites molécules par la méthode de Bradford (Bradford 1976). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur l'interaction du colorant (bleu de Coomassie G-250) avec les résidus basiques et les résidus hydrophobes présents dans la protéine. Le colorant se lie à la protéine par des interactions non covalentes (ponts hydrogènes, interactions hydrophobes et ioniques). Une gamme étalon de BSA est préparée, et une mesure d'absorbance à 595 nm est réalisée avec addition de réactif de Bradford pour cette gamme en parallèle

de différentes dilutions de la fraction de conjugués. Les résultats d'absorbance permettent de déterminer la concentration de protéine dans la fraction d'intérêt.

2.2.2. SPECTROMETRIE DE MASSE

Afin de déterminer le nombre de molécules de polluant fixées par porteur, des analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées. Les expériences ont été réalisées sur un appareil de type Q-TOF (Bruker Daltonics, Bremen) muni d'une source électrospray. L'ionisation a été effectuée par électrospray en mode positif (à pH acide) dans un solvant eau/méthanol contenant 0,1 % d'acide formique afin de dénaturer la protéine et d'avoir plus d'états de charges. L'analyseur à temps de vol permet la mesure du temps que met un ion, préalablement accéléré, à parcourir une distance donnée. La vitesse des ions dépendant du rapport masse/charge, ce rapport est déterminé par la mesure de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération.

Le spectre obtenu représentant l'intensité en fonction du rapport masse sur charge (Figure 4-2), permet d'observer des pics correspondants aux différents états de charge. Cela permet alors de revenir à la masse de la protéine. La comparaison du spectre de la protéine native et de celui de la protéine modifiée, permet de déterminer le changement de masse moyen pour chaque état de charge. Pour un état de charge donné, le pic est décalé vers m/z plus important, en multipliant par la charge, on obtient la différence de masse entre les deux états. La masse des petites molécules de polluant étant connues, le nombre moyen de petites molécules greffées est alors aisément calculé. Pour BSA-2,4-D on obtient par exemple ici 3,9 molécules de 2,4-D greffées par molécule de BSA. Ces analyses sont réalisées sur l'ensemble de nos conjugués BSA-petite molécule.

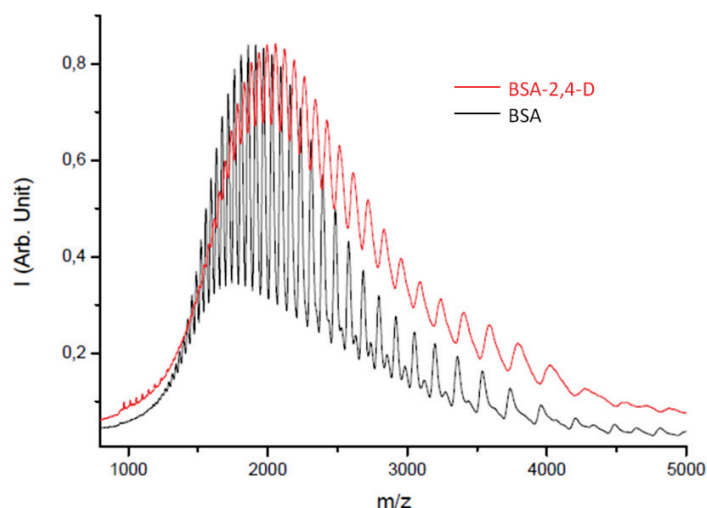


Figure 4-2. Spectre de masse de la BSA et du conjugué BSA-2,4-D

2.3. PREPARATION DES PUCES PAR DEPOT AUTOMATISE DE FAIBLES VOLUMES

2.3.1. PRINCIPE GENERAL

Afin de générer des matrices de plots en fond de puits de plaque 96-puits (fond de puits membranaires ou adhésif), un automate de dépôt non contact a été utilisé. Cet appareil utilise une technique de dépôt basée sur des impulsions électriques administrées à un cristal piézoélectrique, permettant l'éjection de gouttes de volume très faible (quelques centaines de picolitres) à des coordonnées x, y et z prédéfinies avec une précision de 5 μm . Il est ainsi possible d'obtenir des plots uniformes et réguliers, correspondant à un volume précis. L'ensemble du processus est contrôlé informatiquement, un logiciel contrôle les positions, les volumes prélevés et déposés, la forme de la matrice désirée etc. Dans un premier temps, la solution de dépôt est prélevée par un capillaire en verre. Le bras articulé de l'automate permet ensuite le déplacement du capillaire jusqu'à le positionner devant une caméra (dans le cas du SciFlex Arrayer S3), afin de contrôler la forme et la direction des gouttes éjectées. Si la goutte est valide, le capillaire est déplacé à la position préenregistrée dans le logiciel de contrôle, correspondant à la position du premier plot. Le dépôt est effectué et le capillaire est ensuite déplacé à la position du plot suivant pour procéder au second dépôt, et ainsi de suite pour toutes les positions désirées pour cette solution. Plusieurs cycles de lavage du capillaire sont ensuite effectués avant qu'une nouvelle solution ne soit prélevée et que l'automate n'opère un nouveau cycle de dépôts.

Les réglages (nombre de gouttes ou volume, écartement entre les plots, taille et disposition de la matrice de plots) sont optimisés pour les différentes applications traitées, ceux-ci seront donc explicités ci-après dans chacune des parties correspondantes.

Le dépôt est réalisé soit sur plaque 96-puits à fond membranaire, sur la face extérieure des membranes, soit sur un adhésif qui est ensuite assemblé à une plaque 96-puits sans fond (Figure 4-3).

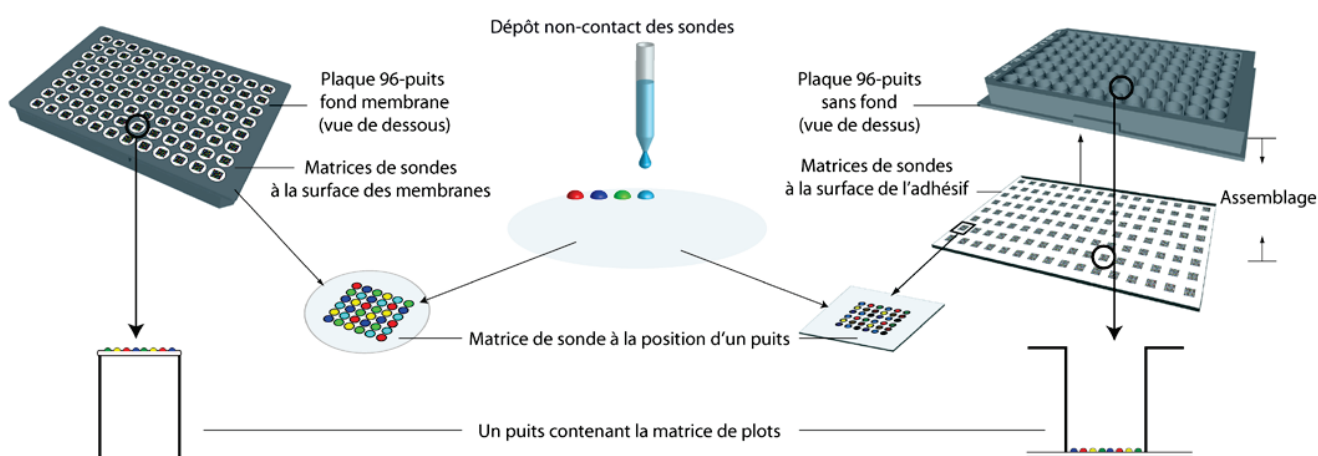


Figure 4-3. Dépôt des sondes sur support membranaire ou adhésif pour utilisation en fond de plaque 96-puits

Deux automates ont permis la réalisation des puces.

BioChip Arrayer BCA1 (Perkin-Elmer)

Cet automate est le plus ancien, il est utilisé pour la réalisation des puces d'allergènes et de TAA. Quatre micro-capillaires indépendants sont utilisés, permettant le dépôt de quatre solutions simultanément. Le volume d'une goutte est de 300 pL. Les étapes de prélèvement et éjection sont contrôlées à l'aide d'un capteur de pression. La forme de la goutte et la vitesse d'éjection peuvent être modifiées en ajustant les paramètres de l'impulsion piézoélectrique.

SciFlex Arrayer S3 (Scienion)

Cet automate, plus récent, a été utilisé pour la réalisation des puces de polluants. Un seul capillaire est utilisé, et les solutions sont déposées les unes après les autres. Les paramètres de l'impulsion piézoélectriques sont ici aussi optimisés, et la forme et la vitesse d'éjection de la goutte sont contrôlées à l'aide d'une caméra avant et après chaque cycle de dépôt. Cet appareillage permet donc un meilleur contrôle par l'utilisateur, mais il est aussi caractérisé par une plus grande vitesse de réalisation des procédés, ainsi que par une précision améliorée.

2.3.2. PREPARATION D'UNE PUCE POUR LA DETECTION D'ALLERGENES

Le dépôt des allergènes a été réalisé sur la face extérieure des membranes composant le fond des puits, avec l'automate BCA1 précédemment décrit. Le volume a été optimisé à 2,4 nL par plot (chaque goutte contenant 300 pL de solution, 8 gouttes ont été déposées) et avec une distance entre les plots de 500 µm. Pour les tests effectués, les solutions d'allergènes ont été utilisées à des concentrations arbitraires, maximales par rapport aux solutions stocks reçues, et différentes pour chacune d'entre elles (de 18 µg/mL à 1,86 mg/mL). Ceci ne faussera pas l'interprétation des résultats puisqu'ils seront normalisés de façon à être comparés allergène par allergène. 12 protéines sondes ont été déposées sur les membranes sous la forme d'une matrice de 26 plots (Figure 4-4) : 8 protéines recombinantes et 2 extraits correspondant aux allergènes (2 réplicats) ainsi que 2 contrôles (une solution d'IgE de référence et une solution d'IgE marquée par la phosphatase alcaline) (3 réplicats).



Figure 4-4. Matrice des sondes allergènes

2.3.3. PREPARATION D'UNE PUCE POUR LA DETECTION DE BIOMARQUEURS DE CANCER

Le dépôt des sondes a été réalisé sur la face extérieure des membranes composant le fond des puits, avec l'automate BCA1 précédemment décrit. Le dépôt a été réalisé avec un volume optimisé de 2,4 nL par plot (8 gouttes de 300 pL), avec une distance entre les plots de 500 µm. Les différents antigènes ont été déposés en solution dans du PBS contenant 1 mg/mL de bleu de bromophénol. 15 protéines sondes ont été déposées en 3 réplicats sur les membranes, composant une matrice de 45 plots (Figure 4-5) : 12 antigènes associés aux tumeurs et 3 contrôles (IgG humain, anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline, albumine de sérum bovin).

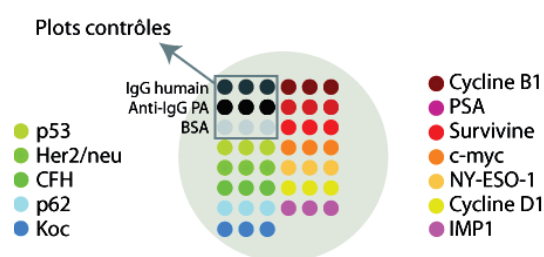


Figure 4-5. Matrice des sondes d'antigènes associés aux tumeurs

2.3.4. PREPARATION D'UNE PUCE POUR LE CONTROLE DE LA QUALITE DE L'EAU

Le dépôt des sondes a été réalisé sur de l'adhésif sensible à la pression, avec l'automate SciFlex S3 précédemment décrit. Les solutions de conjugués ont été utilisées dans du tampon acétate KCl, contenant 0,5 mg/mL de bleu de bromophénol comme contrôle de dépôt. 0,8 nL de chaque solution a été déposé avec un écart de 450 µm entre les plots, en une matrice de 49 plots (7x7).

Pour la première partie de l'étude (Figure 4-6 matrice I), concernant le criblage des conjugués et les tests de sélectivité, tous les conjugués ont été déposés en 2 réplicats, avec le contrôle positif en 3 réplicats (streptavidine marquée par la phosphatase alcaline) et les sept contrôle d'interaction non-spécifique en 3 réplicats également (BSA-4-BBA, latex-4-BBA, dextran-4-BBA, BSA, latex, dextran et bleu de bromophénol).

Pour la seconde partie de l'étude (Figure 4-6 matrice II), concernant la calibration du test, et la détection multiplexe de polluants, la matrice a été composée de cinq réplicats des conjugués choisis, un pour chaque polluant, de trois réplicats du contrôle positif et de trois réplicats pour les sept contrôles des interactions non-spécifiques. Le support adhésif a ensuite été directement assemblé avec une plaque 96-puits sans fond, comme décrit à la Figure 4-3.

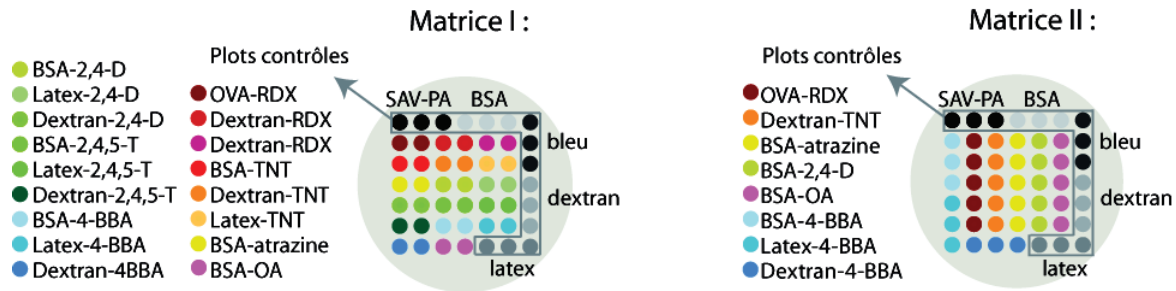


Figure 4-6. Matrice des sondes de polluants

2.4. PREPARATION DES PUCES PAR SERIGRAPHIE

2.4.1. PRINCIPE GENERAL

La sérigraphie est un procédé d'impression utilisant un masque constitué d'un maillage qui laisse passer l'encre déposée à l'aide d'une raclette selon un motif précis. Ce processus est capable d'imprimer sur de nombreuses matières : papiers, tissus, plastiques, métaux, verres, céramiques etc. Au laboratoire, et dans le cadre de cette thèse, l'appareil DEK 248 est utilisé pour la sérigraphie d'électrodes de carbone sur du plastique de polycarbonate transparent, ou sur du papier. Différents masques, tissés de fibres de polyester mono-filament, d'une taille de maille de 0,1 mm (260 ppp), et d'une épaisseur de 13µm sont utilisés, correspondant aux différents motifs à produire. Lors du processus de sérigraphie, le support à imprimer est placé en contact avec le masque, et la raclette de polyuréthane est déplacée le long du masque avec une pression appliquée prédéfinie, de façon à ce que l'encre soit poussée au travers des motifs sur le support (voir Figure 4-7). L'écartement entre le support et le masque, la pression appliquée sur la raclette, le nombre et la vitesse des passages de la raclette sur le support ainsi que la vitesse de séparation entre le support et le masque sont des paramètres à contrôler et à optimiser afin d'obtenir les caractéristiques recherchées pour les puces.

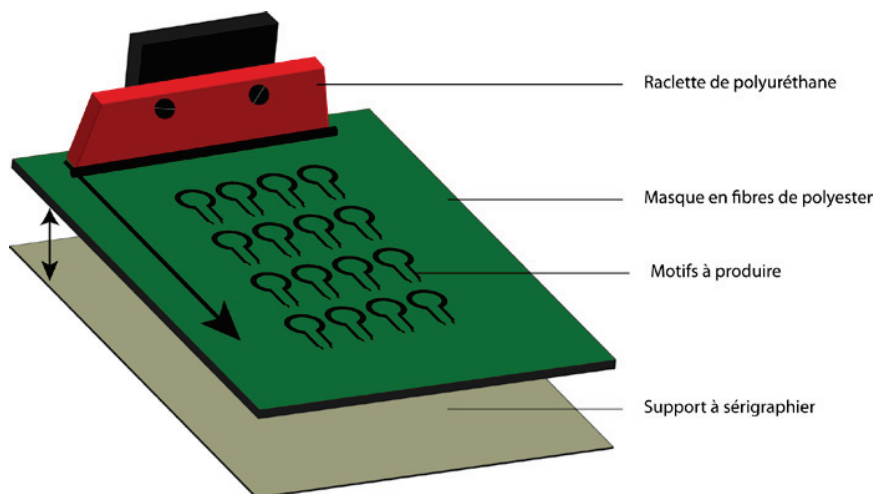


Figure 4-7. Principe de sérigraphie des électrodes

Lors de la préparation des puces par sérigraphie, plusieurs étapes sont suivies. La première consiste en la vérification des réglages, et notamment en l'alignement du support avec la zone à motifs du masque. Le premier type d'encre déposé est une encre de carbone (Electrodag 423 SS), composée de particules de graphite d'environ 1 μm de diamètre, dispersées dans un polymère conducteur thermosensible. Les supports sont placés à l'étuve (100°C, 10 minutes) directement après impression afin de permettre la polymérisation et le séchage de l'encre. Pour les puces sérigraphiées sur support de polycarbonate, une couche de vernis hydrophobe isolant (Minico M7000) est ensuite déposée à l'aide d'un second masque, par-dessus les électrodes de carbone. Pour cela, l'alignement des puces de carbone avec le masque « vernis isolant » est réalisé à l'aide d'un système de caméras, assisté par ordinateur à l'aide du logiciel Dek Align 4. Après impression, les supports sont une nouvelle fois cuits afin de permettre la polymérisation et le séchage du vernis isolant.

2.4.2. SERIGRAPHIE SUR POLYCARBONATE POUR LA DETECTION DE PRECURSEURS D'EXPLOSIFS

La sérigraphie des puces pour la détection de précurseurs d'explosifs a été réalisée sur des supports de polycarbonate transparents, selon un motif présenté Figure 4-8. Elles sont constituées de 8 électrodes de travail d'un diamètre de 0,6 mm, et d'une contre électrode centrale, faisant face à une pseudo-référence. L'impression d'un vernis isolant permet la délimitation d'une zone de travail et de mesure, susceptible d'être recouverte par une goutte d'un volume de 35 μL . Ces puces ont été ensuite modifiées par électrodépôt de métaux (décrits dans le paragraphe 2.5.1 page 144).

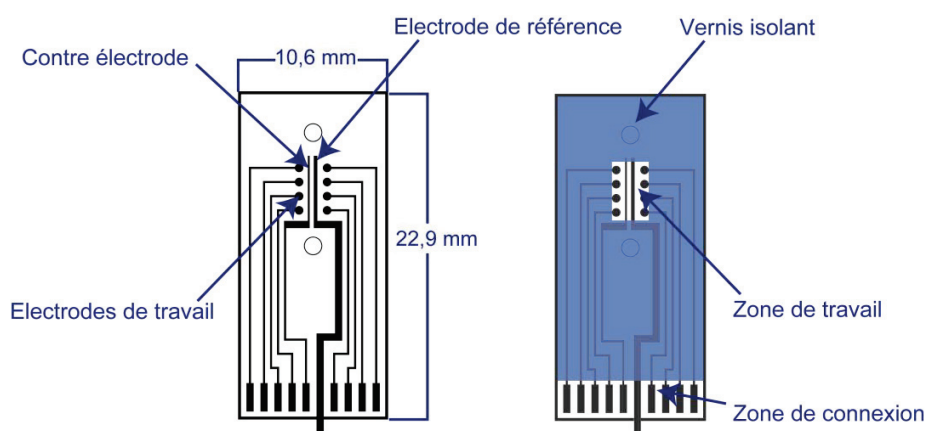


Figure 4-8. Préparation de la puce de polycarbonate pour la détection de précurseurs d'explosifs

2.4.3. SERIGRAPHIE SUR PAPIER POUR L'IMMUNODETECTION DE POLLUANTS

La sérigraphie du troisième type de puces pour l'immunodétection de polluants a été réalisée sur un support papier, selon le motif présenté sur la Figure 4-9. Elles sont constituées d'une électrode de travail, entourée d'une contre électrode faisant également office de pseudo-référence.

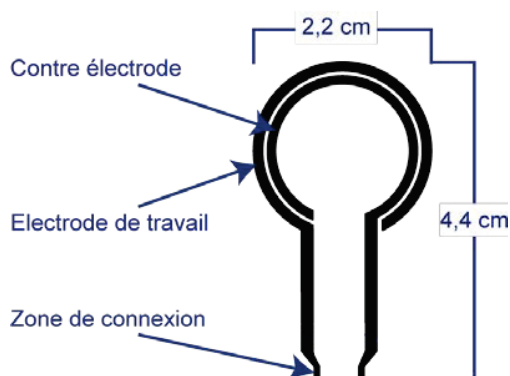


Figure 4-9. Préparation de la puce sur papier pour la détection de polluants

2.5. MODIFICATION DES PUCES SERIGRAPHIEES

2.5.1. ELECTRODEPOSITION DE METAUX ET ASSEMBLAGE DE LA PUCE

Quatre des huit électrodes de travail des puces ont été modifiées (Figure 4-10) dans le but de générer différentes surfaces pour les mesures électrochimiques. Trois métaux ont été électrodéposés indépendamment par chronopotentiométrie en mode galvanostatique, où un courant constant a été appliqué pendant 10 minutes, conduisant à une charge fixe, optimisée pour chaque type de métal. En pratique, une goutte de 40 μL de solution a été déposée sur la zone de travail. Les dépôts de palladium et d'or ont été réalisés avec un courant fixé à $-30 \mu\text{A}$, en présence d'une solution de HAuCl_4 ou $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ à une concentration de 10 mM, dans HCl à 0,1 M. Un courant de $-15 \mu\text{A}$ a été appliqué pour le dépôt de platine, en présence d'une solution de H_2PtCl_6 à une concentration de 10 mM dans HCl 0,1 M. Enfin, un courant de $-15 \mu\text{A}$ a été appliqué à une électrode de carbone nue, dans une solution de HCl 0,1 M. A la suite de chaque électrodépôt, les puces sérigraphiées ont été rincées par de l'eau milliQ.

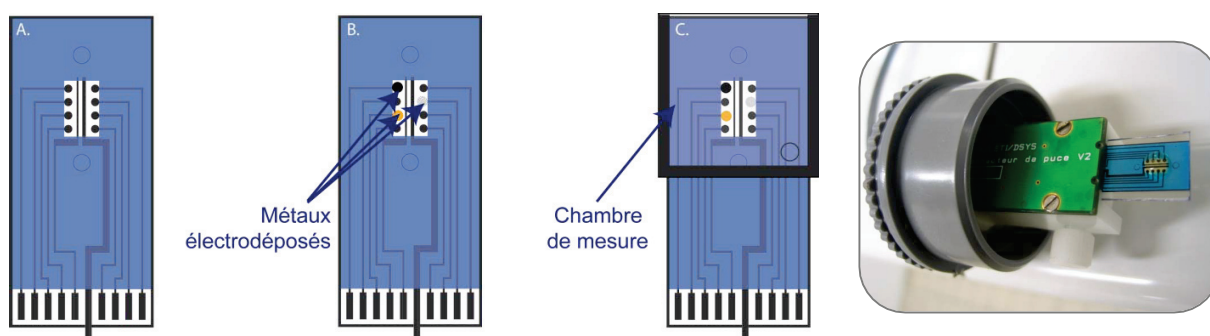


Figure 4-10. Modification de la puce

A. Puce sérigraphiée sur polycarbonate B. Électrodépôt de métaux : or, palladium et platine, sur trois des électrodes de travail, C. Création d'une chambre de mesure. Encart : photographie de la puce branchée au connecteur multi-voie

Une fois les électrodes de travail modifiées, une chambre de mesure a été créée grâce à l'assemblage de la puce avec une fenêtre de plastique de dimensions 15x15 mm percée d'un évent, à l'aide d'un adhésif

double face coupé en forme de U avec un appareil SilhouetteSD. Cet assemblage définit une chambre qui se remplit par capillarité avec un volume constant de 35 μL .

Dans le but de réaliser des mesures directement dans les tuyaux d'évacuation d'eaux usées, un outil complet a été imaginé, permettant d'assembler la puce électrochimique avec la canalisation et de lancer facilement la mesure. Cet outil est présenté sur la Figure 4-11.

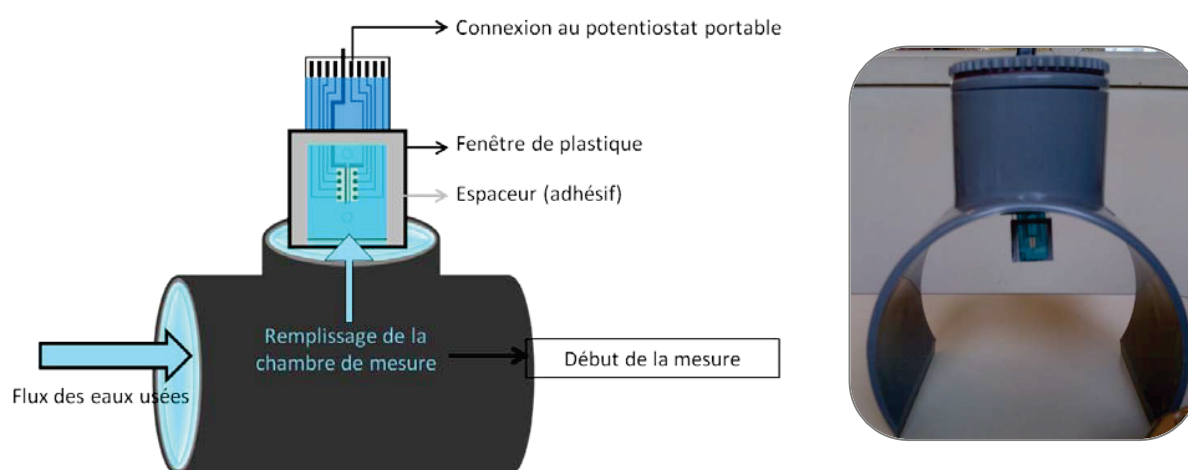


Figure 4-11. Outil d'assemblage de la puce aux tuyaux d'évacuation

Le principe de l'utilisation de la puce sur site est présenté ici, en présence d'un flux de liquide dans les canalisations, la chambre de mesure de la puce se remplit avec un volume constant par capillarité. Encart : photographie du système

2.5.2. PREPARATION ET ASSEMBLAGE DE LA PUCE DE PAPIER

Pour ces puces sérigraphiées sur papier, qui permettent la diffusion des solutions par capillarité, la surface de travail n'est plus délimitée par du vernis isolant imprimé mais par un polymère de polydiméthyl siloxane (PDMS) (Figure 4-12) déposé après sérigraphie de la puce, puis cuit à 100°C pendant 10 minutes pour permettre la polymérisation et le séchage. Ce polymère pénètre dans les fibres du papier et sert de barrière au solvant, permettant ainsi de conserver la zone de connexion des électrodes isolée, tout en permettant une diffusion des réactifs dans la zone de travail de l'électrode. Un adhésif est ensuite utilisé de façon à délimiter une zone de dépôt centrale, permettant aussi la protection de l'électrode de carbone.

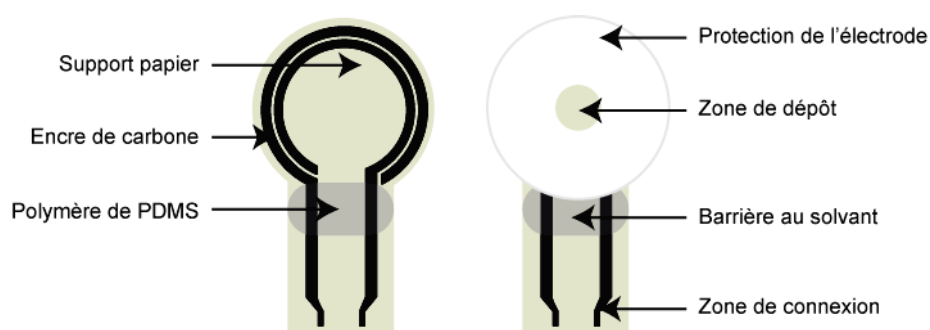


Figure 4-12. Préparation et assemblage de la puce sur papier

2.6. CARACTERISATION DES POLYMERES ET DES SURFACES

2.6.1. PROFILOMETRIE NON-CONTACT A CAPTEUR CONFOCAL

Afin d'observer la topographie des surfaces des électrodes, un profilomètre NJ-Optimal à capteur confocal à haute résolution a été utilisé. Cet appareil, conçu pour la mesure de haute précision des micro- et nano-géométries de surface, permet la mesure du profil d'une surface jusqu'à 100x100 mm et la création d'une image en trois dimensions de la surface analysée. L'appareil et son principe de fonctionnement sont présentés sur la Figure 4-13. Un objectif chromatique projette l'image d'un point source de lumière blanche sur la surface de l'échantillon. Les images monochromatiques du point source sont situées à des positions z différentes pour chaque longueur d'onde. La surface de l'objet va diffuser la lumière incidente, et la lumière rétrodiffusée va traverser l'objectif en sens inverse, être séparée et arriver sur un orifice de filtrage, qui ne laisse passer que la longueur d'onde focalisée. La lumière collectée, analysée par spectrométrie, permet d'obtenir une courbe d'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde : l'intensité maximale est obtenue pour la longueur d'onde focalisée, en relation directe avec la position de l'échantillon. La surface est balayée selon les axes X et Y motorisés de l'appareil, et l'ensemble des profils obtenus permet la visualisation d'une image en 3 dimensions de la surface, avec une résolution x/y proche de 1 μm .

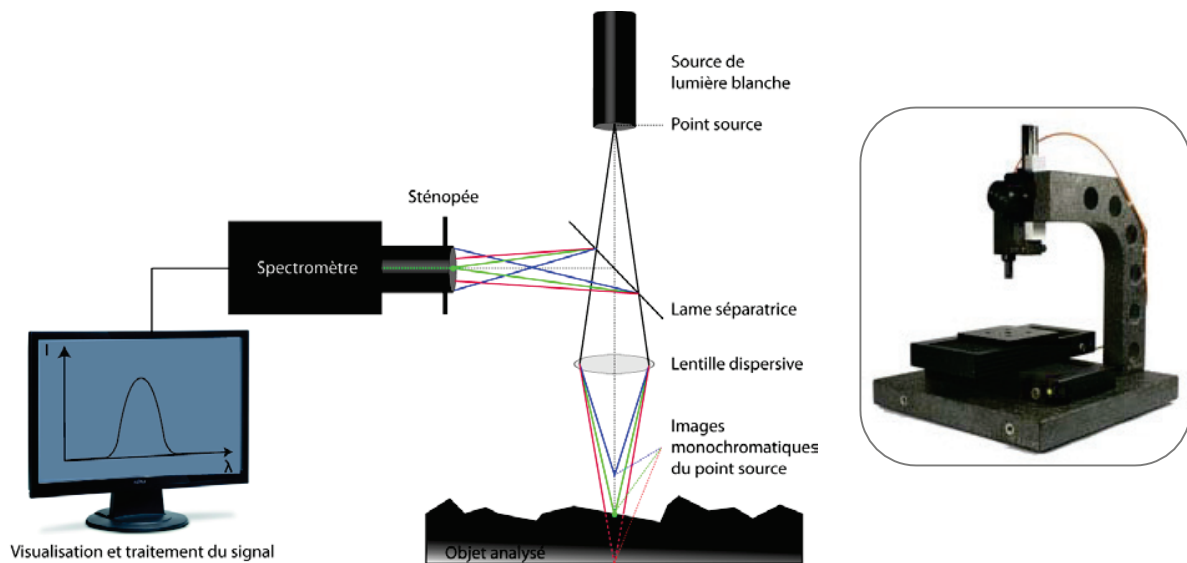


Figure 4-13. Profilomètre NJ-Optimal

Principe de fonctionnement du profilomètre. Encart : photographie de l'appareil

2.6.2. MICROSCOPIE OPTIQUE

Les électrodépôts de métaux ont été observés à l'aide d'un microscope optique Axioskop Zeiss, en mode de contraste interférentiel différentiel, aussi appelé technique Normaski. Le contraste interférentiel différentiel utilise de la lumière polarisée, et exploite les interférences entre deux faisceaux de l'onde lumineuse traversant l'échantillon. Un polariseur et un analyseur sont insérés sur le trajet optique avant

le condenseur et après l'objectif. La lumière polarisée est divisée au niveau d'un premier prisme de Normaski au niveau du condenseur, puis traverse l'échantillon. La déviation de phase induite par l'échantillon est d'ampleur différente pour les deux faisceaux selon la structure de l'échantillon. La lentille de l'objectif est associée à un second prisme de Normaski qui recombine les faisceaux incidents en un faisceau unique : la déviation de phase est alors convertie en variations d'amplitude, traduites par le contraste. Cette technique donne une vision en pseudo-trois dimensions d'un objet translucide, grâce à l'utilisation de la lumière polarisée et d'un jeu de filtres spéciaux, les images sont observées avec une bonne visualisation du relief.

2.6.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Les images de microscopie électronique à balayage ont été enregistrées au Centre Technologique des Microstructures de l'Université Lyon 1 sur un microscope Hitachi S800 FEG, fournissant une résolution de 2 nm à 30 kV pour une distance de travail de 5 mm et des tensions d'accélération possibles allant de 1 à 30 kV. Un faisceau d'électrons projeté sur l'échantillon à analyser génère des électrons secondaires de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur amplifiant le signal. À chaque point d'impact sur le détecteur correspond un signal électrique dont l'intensité dépend de la nature et de la topographie de l'échantillon au point d'impact. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Pour les échantillons non conducteurs, il est nécessaire d'effectuer au préalable une métallisation de la surface, réalisée dans notre cas en déposant une couche de carbone d'une épaisseur de 4 nm.

2.6.4. ANALYSE ELEMENTAIRE PAR ENERGIE DISPERSIVE DE RAYONS X

Les analyses par microscopie électronique à balayage ont été couplées à des analyses élémentaires par énergie dispersive de rayons X (EDX). La rencontre entre le faisceau électronique incident et les atomes de la surface de l'objet génère des photons X, captés par un détecteur. Un élément donné émet des photons X caractérisés par leur énergie car chaque émission correspond à une transition électronique. Le traitement des signaux X permet de trier les photons par énergie, d'attribuer chaque photon détecté à un élément chimique (analyse qualitative) mais aussi de compter les photons en fonction de leur énergie (en eV). Il est donc possible de procéder à une analyse chimique quantitative localisée de la surface d'un échantillon. Ici, la métallisation de la surface a été réalisée par une couche de carbone, et l'analyse est effectuée avec un tilt de 45°, une tension d'accélération de 15 kV et un temps de comptage moyen de 45 secondes.

2.7. IMMUNOESSAIS

2.7.1. AUTOMATISATION DES ESSAIS SUR PLAQUE 96-PUITS

Afin de permettre l'analyse haut-débit des échantillons sur plaque 96 puits, le protocole de test a été automatisé à l'aide d'un appareil EVO75 présenté Figure 4-14. Cet automate, contrôlé par ordinateur grâce au logiciel EVOWARE permet de réaliser l'intégralité du processus pour les immunoessais sur

plaque 96-puits, à fond membranaire ou adhésif, sans intervention de l'utilisateur. Il est en effet équipé d'un bras articulé, permettant le déplacement des plaques et couvercles et d'un bras pipeteur 8 canaux, rendant possible le transfert des solutions par colonne, depuis les bacs réservoirs ou les plaques échantillons. Il comprend également un bloc chauffant, pour l'incubation des plaques à des températures définies, une unité de filtration sous vide pour l'élimination des solutions à travers les membranes en fond de puits, et une station de lavage, permettant l'élimination des solutions et le rinçage des puits dans le cas des plaques à fond adhésif. Les temps d'incubation sont précisément contrôlés selon les informations transmises par le logiciel, à l'aide duquel toutes les étapes sont programmées. L'appareil est associé à un scanner de bureau, utilisé pour acquérir les images une fois les signaux révélés par colorimétrie.

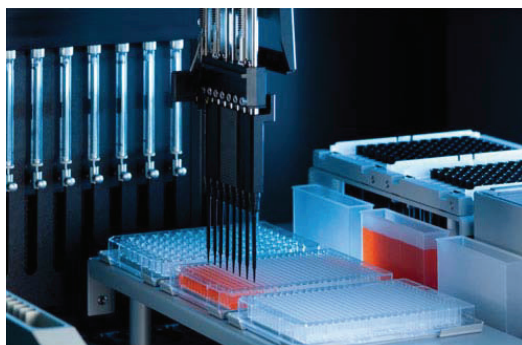


Figure 4-14. Automate EVO75

2.7.2. IMMUNOESSAIS SUR PLAQUE A FOND MEMBRANAIRE EN MODE DIRECT

Le protocole d'immunodétection en mode direct est utilisé pour les outils diagnostiques (allergie et cancer), à l'aide desquels des anticorps sont détectés. Il est réalisé de façon automatisée avec l'appareillage décrit au paragraphe 2.7.1 ci-dessus, avec filtration des solutions au travers des membranes.

2.7.2.1. IMMUNOESSAIS EN MODE DIRECT « EN UNE ETAPE » POUR LE DIAGNOSTIC DES ALLERGIES

Ce protocole, utilisé pour le diagnostic d'allergies, implique les étapes suivantes (Figure 4-15): les membranes composées de la matrice présentée sur la Figure 4-4 sont tout d'abord saturées avec du PBSTA (200 μ L/puits, 10 minutes, température ambiante). Les échantillons de sérum dilués au dixième sont pré-incubés avec les anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgE humaine marqués par la phosphatase alcaline) à une concentration de 2 μ g/ml dans du PBSTA (10 minutes, 37°C) puis cette solution est incubée sur la membrane (100 μ L/puits, 30 minutes, 37°C). Une solution de BCIP/NBT est ensuite ajoutée dans chaque puits (200 μ L/puits, 20 minutes, température ambiante) afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage final par du PBS permet de stopper la réaction enzymatique produisant la coloration. Entre chaque étape et avant le début du protocole, un lavage avec du PBS (2 x 400 μ L/puits) est réalisé afin d'éliminer toutes les molécules n'ayant pas été retenues. Le lavage

avant l'incubation du BCIP/NBT est réalisé en remplaçant le PBS par du VBS, de façon à ne pas diminuer l'activité de la phosphatase alcaline, partiellement inhibée par le phosphate.

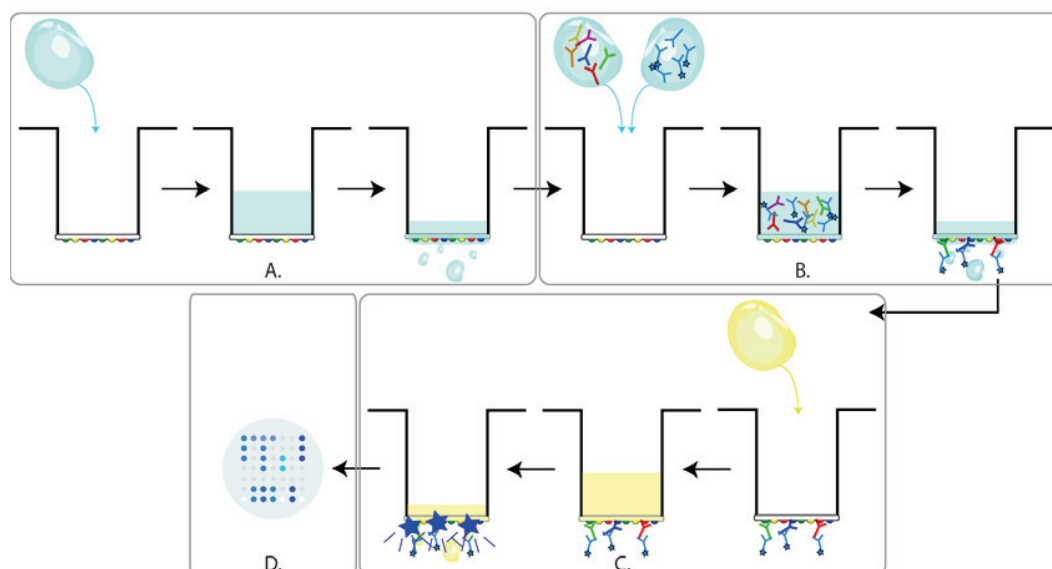


Figure 4-15. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour le diagnostic d'allergies (1 étape)

A. Saturation des membranes, B. incubation des échantillons de sérum en présence des anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline, C. incubation d'une solution de BCIP/NBT pour la génération du signal, D. acquisition de l'image des membranes et quantification des résultats. Chaque étape consiste en 3 parties, le dépôt de la solution, l'incubation et la filtration à travers la membrane.

2.7.2.2. IMMUNOESSAIS EN MODE DIRECT « EN DEUX ETAPES » POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER

Ce protocole, utilisé pour le diagnostic du cancer, est réalisé avec des étapes séparées d'incubation des anticorps primaires et secondaire contrairement à celui pour le diagnostic d'allergies, comme décrit sur la Figure 4-16. Ce changement est effectué afin de minimiser le signal non spécifique pouvant apparaître du fait de la concentration importante en IgG dans les échantillons. Il implique les étapes suivantes : les membranes composées de la matrice présentée sur la Figure 4-5 sont tout d'abord saturées par du LowCross Buffer (200 µL/puits, 10 minutes, température ambiante). Les échantillons de sérum dilués au dixième dans du LowCross Buffer sont pré-incubés dans une plaque de préparation (10 minutes, 37°C) puis transférés dans les puits et incubés sur les membranes (100 µL/puits, 1 heure, 37°C). Les anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgG humaine marqués par la phosphatase alcaline) à une concentration de 0,6 µg/mL dans du LowCross Buffer sont à leur tour incubés (100 µL/puits, 1 heure, 37°C). Une solution de BCIP/NBT est ensuite ajoutée dans chaque puits (200 µL/puits, 20 minutes, température ambiante) afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage final par du PBS permet de stopper la réaction enzymatique produisant la coloration. Entre chaque étape et avant le début du protocole, un lavage par du PBS (2 x 400 µL/puits) est réalisé afin d'éliminer toutes les molécules n'ayant pas été retenues. Le lavage avant incubation du BCIP/NBT est réalisé en remplaçant le PBS par du VBS, de façon à ne pas diminuer l'activité de la phosphatase alcaline, partiellement inhibée par le phosphate.

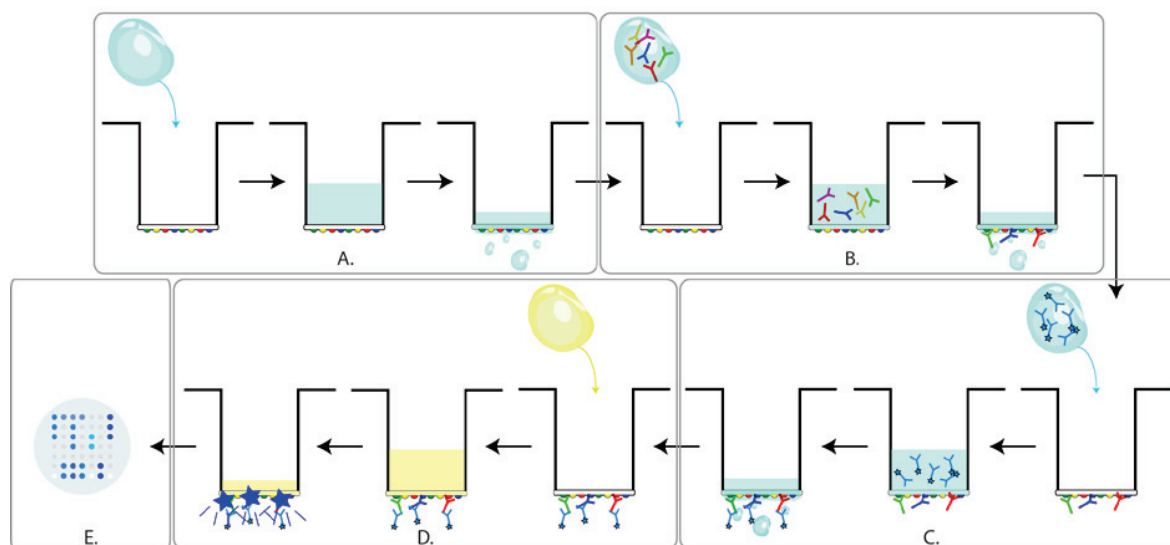


Figure 4-16. Protocole de l'immunoessai en mode direct pour le diagnostic du cancer (2 étapes)

A. Saturation des membranes, B. incubation des échantillons de sérum, C. incubation des anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline, D. incubation d'une solution de BCIP/NBT pour la génération du signal, E. acquisition de l'image des membranes et quantification des résultats. Chaque étape consiste en 3 parties, le dépôt de la solution, l'incubation et la filtration à travers la membrane.

2.7.3. IMMUNOESSAIS SUR PLAQUE A FOND ADHESIF

2.7.3.1. IMMUNOESSAIS EN MODE DIRECT

Ce protocole, utilisé avec la matrice présentée sur la Figure 4-6 a. pour le criblage des conjugués de polluants suivant leur réactivité et réactivité-croisée avec les anticorps, implique les étapes suivantes : les fonds de puits sont tout d'abord saturés par du LowCross Buffer (200 μ L/puits, 10 minutes, 37°C) afin de minimiser les interactions non-spécifiques. Une gamme de concentration de chaque anticorps (anti-pesticides, anti-explosifs et anti-toxines) est ensuite incubée indépendamment dans chaque puits (100 μ L/puits, 1 heure, 37°C), suivie par une incubation des anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgG de souris marqués par la phosphatase alcaline) à une concentration de 0,25 μ g/ml dans du LowCross Buffer (100 μ L/puits, 1 heure, 37°C). Une solution de BCIP/NBT est ensuite ajoutée (200 μ L/puits, 30 minutes, 37°C) afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage avec du PBS permet de stopper la réaction enzymatique produisant la coloration, et du Sika-latex est introduit dans les puits afin d'améliorer le contraste pour l'acquisition de l'image grâce à un scanner de bureau (voir paragraphe 2.8.1.2 page 154). Entre chaque étape, un lavage avec du PBS (3 x 400 μ L/puits) est réalisé afin d'éliminer toutes les molécules n'ayant pas été retenues.

2.7.3.2. IMMUNOESSAIS EN MODE COMPETITIF

Ce protocole, utilisé avec la matrice présentée sur la Figure 4-6 b. pour la détection de polluants implique les mêmes étapes que dans le paragraphe précédent, avec les modifications suivantes : un mélange des anticorps primaires anti-2,4-D, anti-atrazine, anti-RDX, anti-TNT et anti-OA à des concentrations optimales respectives de 0,1 ; 0,1 ; 1 ; 0,2 et 0,01 µg/mL est incubé dans chaque puits (100 µL/puits, 1 heure, 37°C), en présence de différentes gammes de concentration de chaque polluant (pour calibrer l'immunoessai) ou d'échantillons de différentes concentrations en polluant (pour le test de détection) avant de procéder à l'incubation des anticorps secondaires. Ce protocole est présenté sur la Figure 4-17.

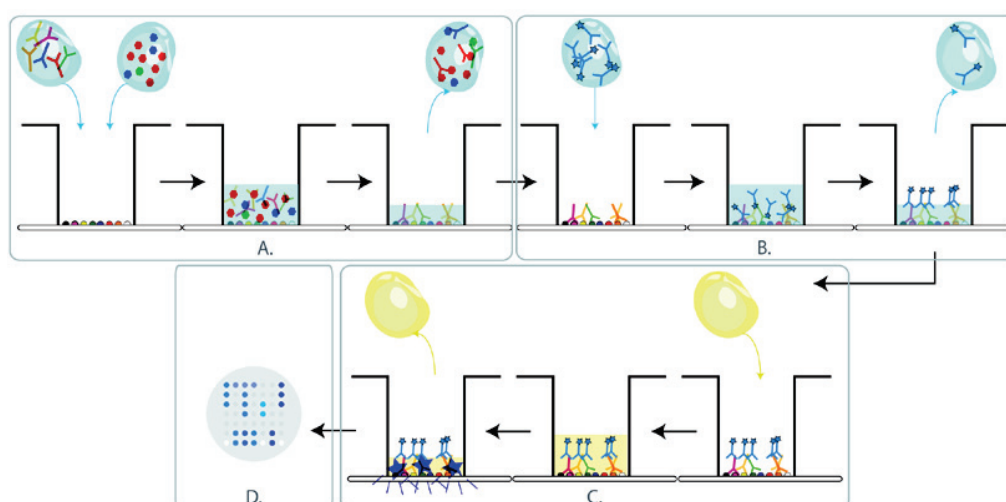


Figure 4-17. Protocole de l'immunoessai en mode compétitif

A. Incubation des échantillons contenant les polluants-cibles en présence des anticorps anti-polluants, B. incubation des anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline, C. incubation d'une solution de BCIP/NBT pour la génération du signal, D. acquisition de l'image de l'adhésif en fond de puits et quantification des résultats. Chaque étape consiste en 3 parties, le dépôt de la solution, l'incubation et le lavage.

2.7.4. IMMUNOESSAIS CLASSIQUES, SUR PLAQUE ELISA

2.7.4.1. IMMUNOESSAIS EN MODE DIRECT

Ce protocole, utilisé sur plaques ELISA classiques, implique les étapes suivantes : les plaques sont tout d'abord modifiées par « coating » avec les solutions de conjugués à des concentrations de 50 µg/mL pour les conjugués BSA, et de 0,1 µM pour les conjugués dextran (50 µL/puits, 2 heures, 37°C). Les fonds de puits sont saturés par du LowCross Buffer (200 µL/puits, 1 heure, 37°C) afin de minimiser les interactions non-spécifiques. Une gamme de concentration de chaque anticorps (anti-2,4-D, anti-TNT et anti-OA) est ensuite incubée indépendamment dans chaque puits (50 µL/puits, 1 heure, 37°C), suivie par une incubation des anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgG de souris marqués par la peroxydase du raifort) à une concentration de 0,6 µg/ml dans du LowCross Buffer (50 µL/puits, 1 heure, 37°C). Entre chaque étape, un lavage avec du PBS (3 x 200 µL/puits) est réalisé afin d'éliminer toutes les

molécules n'ayant pas été retenues. Ce lavage est effectué avec du VBS plutôt que du PBS avant l'étape de révélation. Pour la génération du signal et la lecture, les plaques sont introduites dans un lecteur de plaque par luminescence, où la lumière émise est enregistrée après injection dans chaque puits du mélange de substrats chimiluminescents.

2.7.4.2. IMMUNOESSAIS EN MODE COMPETITIF

Ce protocole, utilisé sur plaques 96 puits classiques pour la détection de pesticides, d'explosifs ou de toxines implique les mêmes étapes que dans le paragraphe précédent, avec l'ajout de l'étape suivante : l'incubation des anticorps primaires est réalisée à une concentration de 1 µg/mL en présence de différentes concentrations des pesticides, explosifs ou toxines avant de procéder à l'incubation des anticorps secondaires.

2.7.5. IMMUNOESSAIS EN SUSPENSION

2.7.5.1. IMMUNOESSAIS EN MODE DIRECT

Ce protocole, effectué dans un tube eppendorf classique de 500 µL contenant les conjugués latex-2,4-D pour l'optimisation des paramètres de la détection de polluants implique les étapes suivantes : les conjugués sont tout d'abord saturés par du PBSTA (200 µL, 30 minutes, 37°C) afin de minimiser les interactions non-spécifiques. Une gamme de concentrations des anticorps anti-2,4-D est ensuite incubée sur les conjugués (100 µL, 30 minutes, 37°C), avant de procéder à l'incubation des anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgG de souris marqués par la phosphatase alcaline) à une concentration de 0,6 µg/ml dans du PBSTA (100 µL, 37 minutes, 37°C). Une solution de BCIP/NBT est ensuite ajoutée (100 µL, 30 minutes, 37°C) afin de générer le signal colorimétrique. Entre chaque étape, trois cycles de lavage-centrifugation avec du PBS (500 µL) sont réalisés afin d'éliminer toutes les molécules n'ayant pas été retenues. Le lavage avant incubation du BCIP/NBT est réalisé en remplaçant le PBS par du VBS, de façon à ne pas diminuer l'activité de la phosphatase alcaline, sensible au phosphate. Ce protocole est présenté sur la Figure 4-18.

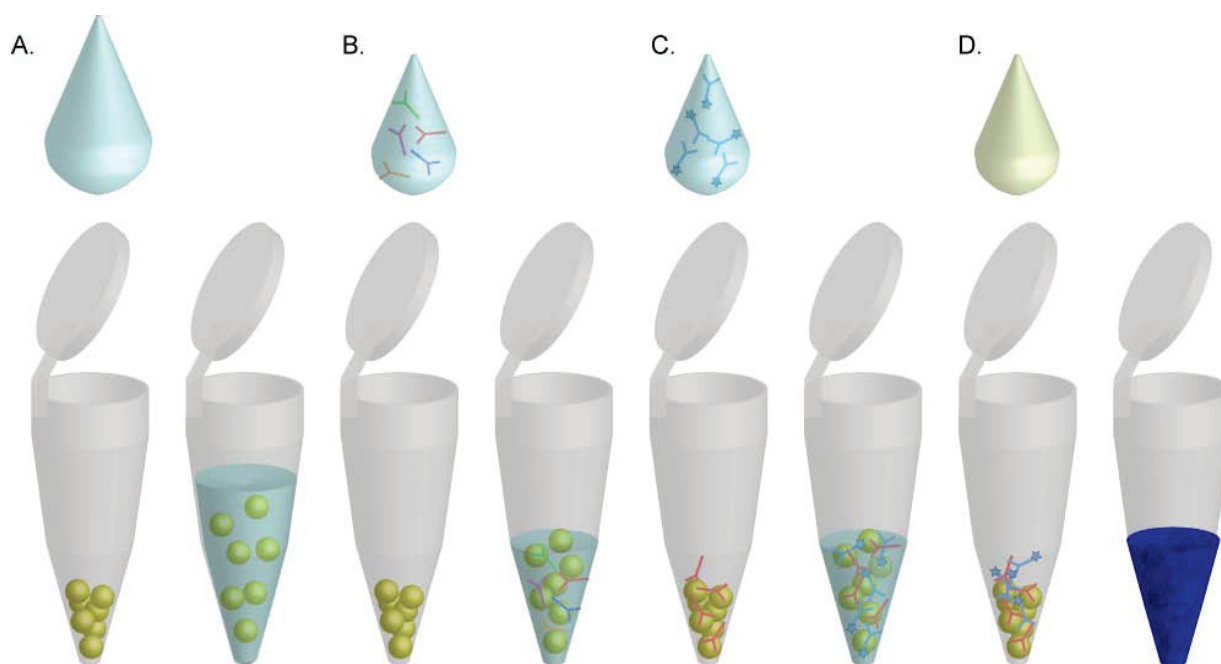


Figure 4-18. Protocole de l'immunoessai en suspension

A. Saturation des conjugués latex-2,4-D, B. incubation des anticorps anti-2,4-D, C. incubation des anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline, D. incubation d'une solution de BCIP/NBT pour la génération du signal et acquisition de l'image des eppendorf pour la quantification des résultats. Chaque étape consiste en 3 parties, le dépôt de la solution, l'incubation et le lavage des billes de latex modifiées.

2.7.5.2. IMMUNOESSAIS EN MODE DEPLACEMENT

Ce protocole, utilisé pour la détection de polluants, implique les mêmes étapes que dans le paragraphe précédent, avec l'ajout de l'étape suivante : après incubation des anticorps secondaires, une gamme de concentration de 2,4-D (100 μ L, 30 minutes, 37°C) est incubée sur les conjugués avant de procéder à la révélation du signal par BCIP/NBT.

2.8. GENERATION ET ANALYSE DES SIGNAUX

2.8.1. COLORIMETRIE

2.8.1.1. GENERATION DU SIGNAL

L'utilisation d'anticorps couplés à la phosphatase alcaline permet, dans les protocoles utilisés ici, la génération d'un signal colorimétrique. Cette enzyme catalyse la formation d'un précipité bleu foncé suivant la réaction explicitée sur la Figure 4-19. Le NBT diformazan précipite à la position exacte de sa production, soit sur les plots marqués par la phosphatase alcaline. La réaction est stoppée par rinçage avec du tampon PBS.

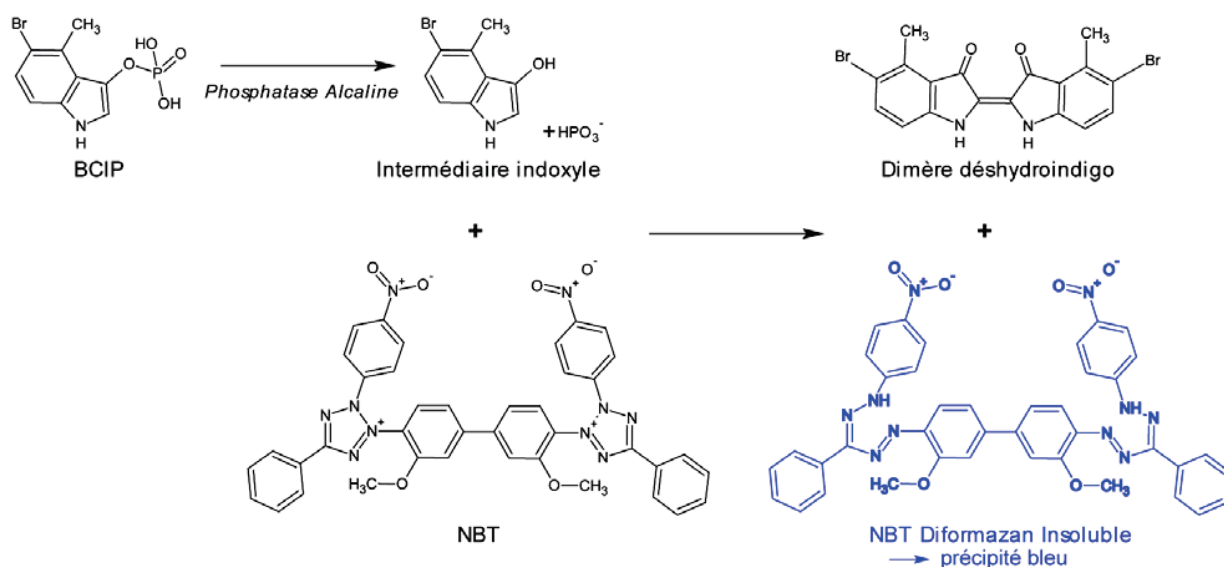


Figure 4-19. Génération du signal colorimétrique catalysée par la phosphatase alcaline

2.8.1.2. MESURE DU SIGNAL

Après séchage des membranes, ou ajout de Sika-latex dans les puits, l'acquisition de l'image de la plaque est réalisée à l'aide d'un scanner de bureau classique (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) en niveau de gris avec une résolution de 2400 ppp.

2.8.1.3. TRAITEMENT DU SIGNAL

Les images obtenues sont traitées avec Adobe Photoshop CS3 (Adobe), en mode niveau de gris à 16 bits/couche, en effectuant un contraste automatique sur l'ensemble des membranes et en inversant l'échelle de gris. Elles sont enregistrées en format TIFF afin d'être analysées à l'aide du logiciel GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments). L'intensité du signal de chaque plot est calculée comme étant l'intensité médiane pour tous les pixels d'une zone circulaire délimitant le plot, et corrigée par une évaluation du bruit de fond local autour du plot. Pour une sonde donnée, l'intensité utilisée pour les calculs correspond à la moyenne des intensités sur l'ensemble des copies de la sonde, corrigée par les valeurs obtenues sur le contrôle correspondant. Un exemple d'image et d'analyse obtenue est présenté Figure 4-20.

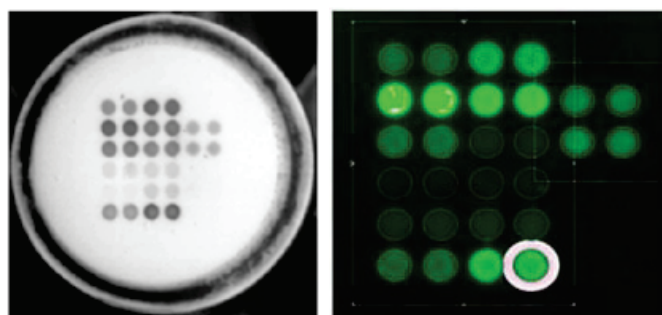


Figure 4-20. Analyse du signal colorimétrique avec GenePix Pro

2.8.2. CHIMILUMINESCENCE

2.8.2.1. GENERATION DU SIGNAL

Les anticorps secondaires des immunoessais avec génération d'un signal chimiluminescent sont marqués par la peroxydase du raifort. Le signal de chimiluminescence est généré par l'utilisation de deux types de solutions. Dans le cas des tests ELISA en plaque 96-puits, une solution préparée au laboratoire et composée de luminol (200 $\mu\text{mol/L}$), de p-iodophénol (200 $\mu\text{mol/L}$) et de peroxyde d'hydrogène (500 $\mu\text{mol/L}$) dans du tampon Véronal est déposée au fond des puits. Le signal est généré par la réaction présentée sur la Figure 4-21.

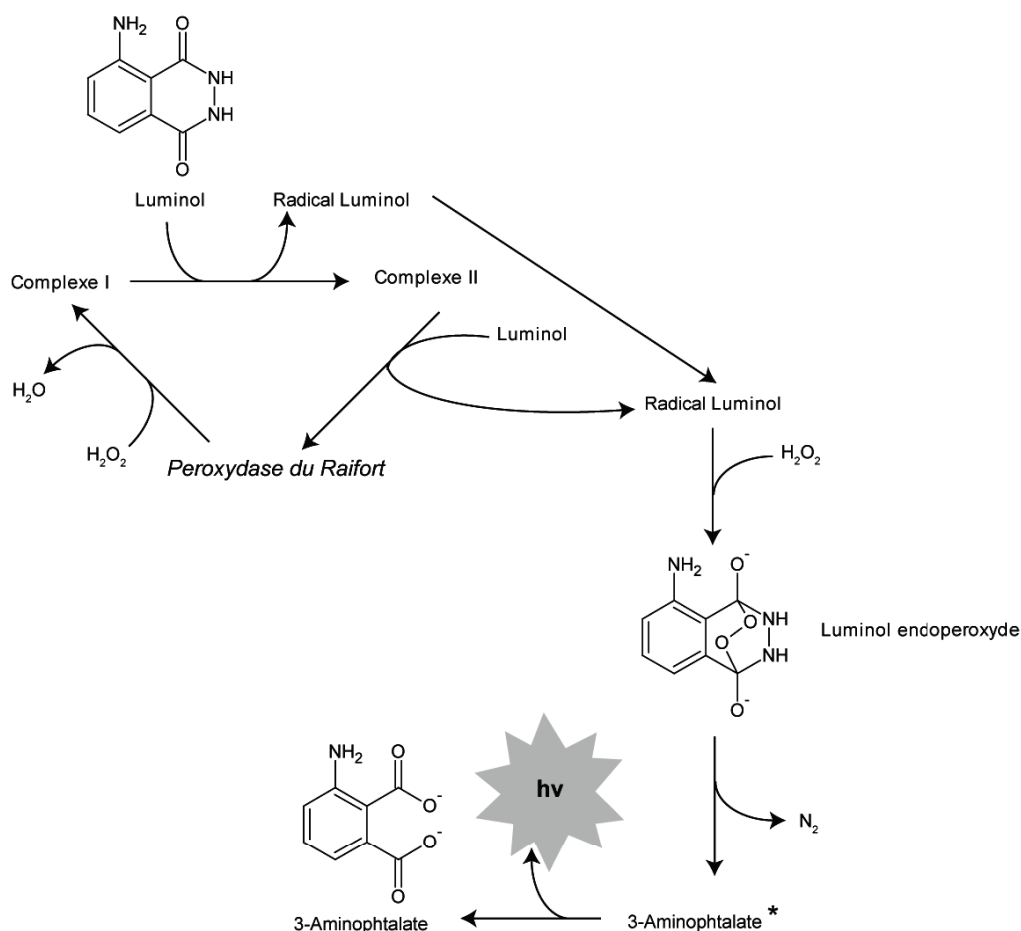


Figure 4-21. Génération du signal de chimiluminescence du luminol, catalysée par la peroxydase du raifort

2.8.2.2. MESURE DU SIGNAL

Les mesures de chimiluminescence sont réalisées à l'aide de deux appareils différents selon le support utilisé. Dans le cas des tests ELISA sur microplaques, un luminomètre permet une mesure directe de l'intensité lumineuse dans chaque puits, après injection de la solution de révélation.

Pour la mesure du signal sur électrodes de plastique, l'acquisition d'une image de la lumière émise à la surface est réalisée à l'aide d'une caméra à capteur CCD. Cette caméra est équipée d'un module refroidissant le capteur à une température de -28°C , ce qui permet de limiter le bruit de fond électronique, et d'une enceinte isolée de la lumière extérieure dans laquelle sont réalisées les mesures. Le support est placé sur un plateau avec une position réglable, et l'intensité lumineuse est mesurée sur des durées allant de quelques secondes à plusieurs minutes.

2.8.2.3. TRAITEMENT DU SIGNAL

Les images correspondant aux signaux de chimiluminescence sont analysées avec le logiciel Image Gauge 4.0. L'intensité du signal de chaque plot est calculée grâce au mode quantification du logiciel comme étant l'intensité totale pour tous les pixels d'une zone déterminée, et corrigée par une évaluation du bruit de fond, sur une zone adjacente.

2.8.3. ELECTROCHIMIE

2.8.3.1. GENERATION DU SIGNAL

2.8.3.1.1. MESURE DIRECTE

En voltammétrie cyclique, le signal est caractérisé par l'intensité du courant en fonction d'un potentiel appliqué et de sa variation au cours du balayage. Les courbes obtenues sont caractéristiques de la composition de la solution électrolytique avec un signal dépendant des espèces électroactives présentes dans le système de mesure composé de l'électrode de travail, de la contre-électrode, et de l'électrode de référence (pseudo-référence dans notre cas). Ces courbes peuvent être utilisées à des fins d'analyse pour déterminer la nature et la concentration des espèces électroactives présentes.

2.8.3.1.2. PAR VOIE ENZYMATIQUE

Pour les études sur électrodes papiers, le signal est généré comme décrit au paragraphe précédent. Toutefois, dans le cas présent, le signal électrochimique correspond à la présence d'un composé électrochimiquement actif choisi, un produit de la réaction catalysée par la phosphatase alcaline. Cette enzyme est une phosphomonoestérase, et elle catalyse la déphosphorylation de substrats phosphorylés déposés sur l'électrode de papier selon la réaction présentée sur la Figure 4-22 (exemple avec le p-aminophényl phosphate).

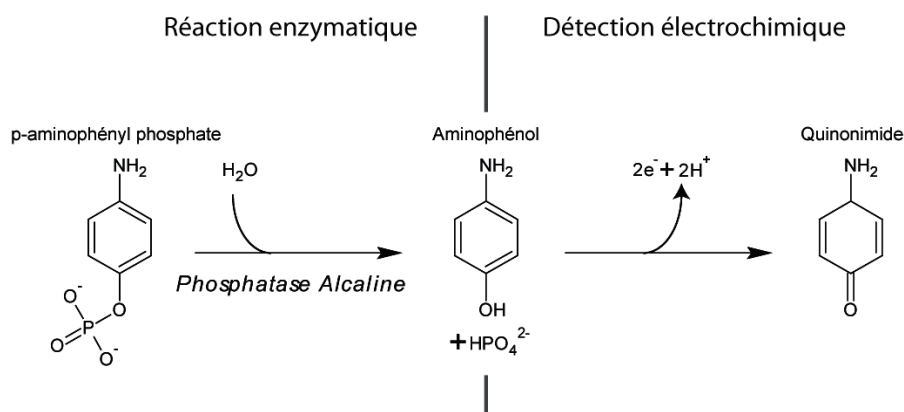


Figure 4-22. Génération du signal électrochimique, catalysée par la phosphatase alcaline

De façon pratique, 5 μL de substrat de l'enzyme, dont les produits permettront la génération du signal électrochimique, sont déposés à des concentrations comprises entre 5 et 500 mM au centre des puces. Les puces sont alors séchées, de façon à obtenir le substrat sec, présent au centre de la puce, prêt à être transformé en un produit électroactif. Le dépôt de 70 μL de solution contenant l'enzyme permet la formation du produit et son déplacement par le solvant vers l'extérieur, où se situent les électrodes de mesure. La mesure est lancée 10 secondes après dépôt, ce temps correspond au temps nécessaire au solvant pour migrer dans le papier.

2.8.3.2. MESURE DU SIGNAL

UTILISATION DU POTENTIOSTAT MULTI-VOIE

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un potentiostat multi-voie, équipé de 4 modules permettant d'effectuer les mesures sur 4 électrodes de travail simultanément, et contrôlé par ordinateur grâce au logiciel ECLab 9.46. Des connecteurs particuliers possédant 10 voies sont utilisés pour les mesures sur puces sérigraphiées sur plastique afin de permettre la connexion individuelle de chacune des électrodes, tandis que les mesures sur les électrodes de papiers sont réalisées à l'aide de pinces.

Plusieurs techniques électrochimiques sont utilisées dans cette thèse. La chronopotentiométrie est utilisée pour les électrodépôts de métaux, comme expliqué au paragraphe 2.5.1 page 144, avec un courant appliqué fixe et un suivi du potentiel en fonction du temps.

La voltammétrie cyclique est utilisée pour la majorité des mesures : sur les électrodes de plastique pour la détection de précurseurs d'explosifs, et pour la calibration sur les électrodes de papier avec signal généré par le produit de réaction de la phosphatase alcaline.

Les conditions précises de mesure ainsi que le traitement du signal seront traités en détails dans le chapitre 6.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 5. Développement d'un outil de détection destiné au diagnostic médical

1. INTRODUCTION

Le développement d'outil d'analyse haut-débit pour le diagnostic a été réalisé au laboratoire sur plusieurs systèmes en parallèle. La première application de puce à protéines concerne le diagnostic des allergies, et a été suivie par une puce pour le diagnostic du cancer.

1.1. UNE REPONSE A DES BESOINS SPECIFIQUES POUR LE DIAGNOSTIC

Les tests d'analyse dans le domaine médical doivent aujourd'hui être multiparamétriques, permettant ainsi d'obtenir le plus d'informations possibles en un temps réduit. De plus, le nombre d'échantillons à tester est en constante augmentation, générant une réelle demande pour de nouveaux supports d'analyse multiplexée à haut-débit. Les biopuces à protéines ou à ADN font partie des nouveaux procédés analytiques pouvant être utilisés dans ce cadre. Une puce destinée au diagnostic, au criblage ou au suivi doit ainsi permettre une analyse sensible, fiable et reproductible, être simple d'utilisation et peu coûteuse. Un nombre restreint de protéines sondes est en général utilisé, de façon à réduire les difficultés d'analyse des résultats, mais celles-ci doivent être représentatives de la pathologie ciblée. Les supports utilisés doivent être adaptés à des protocoles peu coûteux et automatisés, réduisant ainsi le risque d'erreur, simplifiant l'utilisation et augmentant la reproductibilité des tests. La production à grande échelle de ces puces doit également être facilitée grâce à la robotisation complète des procédés.

Les puces à protéines développées dans le cadre de cette thèse permettent de répondre à ces attentes, grâce à différents points-clés.

1.1.1. AUTOMATISATION

La prise en compte des attentes de l'utilisateur final d'un produit doit être une priorité dans le développement d'un outil. Dans le cas d'un outil d'analyse haut-débit, il est nécessaire de simplifier l'utilisation au maximum, non seulement pour diminuer la durée de mise en œuvre par l'opérateur, mais aussi et surtout afin de réduire au maximum les risques d'erreur liés à la manipulation par un opérateur. Dans le but de surmonter ce problème, le système d'analyse sur puce proposé ici permet une automatisation quasi-totale du procédé. En effet, les plaques 96-puits classiques sont traitées par un robot pipeteur EVO75, permettant la mise en œuvre de l'intégralité du protocole d'immunoessai sans intervention de l'utilisateur. Le robot, équipé d'un bras articulé, déplace la plaque 96-puits, remplit les puits des solutions choisies et contrôle les temps d'incubation selon les informations transmises par un programme. Cet appareillage et les procédés liés à son utilisation sont décrits en détails page 147 dans le paragraphe 2.7.1.

1.1.2. ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE

Les standards d'analyse immunologique utilisés à l'heure actuelle sont les tests de type ELISA. Ces tests dédiés à de nombreuses applications, permettent la détection d'une molécule cible par essai. Ces tests monoparamétriques ont prouvé leur utilité mais gagneraient à être améliorés, notamment par

l'augmentation du nombre de molécules cibles analysées. En effet, un diagnostic précis requiert très souvent des informations concernant plusieurs paramètres en même temps. En cela, les biopuces représentent une avancée considérable. L'immobilisation de plusieurs sondes dans chaque puits, rendue possible grâce à un système de dépôt automatisé de très faibles volumes, permet l'analyse simultanée d'un nombre important de paramètres. Cette analyse multiparamétrique présente de nombreux autres avantages, liés aux réductions des volumes d'échantillons nécessaires (moins de sang à prélever par exemple), des volumes des substrats, des durées de manipulations et donc des coûts.

1.2. CONCEPTION DE L'OUTIL D'ANALYSE IMMUNOLOGIQUE A HAUT DEBIT

1.2.1. CHOIX DU SUPPORT

Les puces ont été préparées sur un support de plaques 96-puits dont le fond est constitué d'une membrane de nitrocellulose et ester de cellulose (Multiscreen HTS-HA, Millipore). Ce choix a été effectué sur la base d'études préliminaires réalisées au laboratoire. Différents supports ont été testés, tels que des supports plastiques ou des polymères élastomériques (polydiméthylsiloxane) (Heyries *et al.* 2008) et il est apparu que le type de membranes utilisé dans notre étude offre la meilleure reproductibilité lors du dépôt des protéines, de la reconnaissance antigène/anticorps et de la détection. La porosité des membranes permet une immobilisation des sondes sur une surface spécifique très élevée, générant une augmentation de la densité de protéines par plot, et donc des performances accrues de la puce. De plus, ce support permet l'utilisation d'un protocole entièrement automatisé, et le traitement simultané de nombreux échantillons grâce au format standard de ces plaques couramment utilisées pour les tests de routine. Ceci permet un gain de temps et de coût, mais aussi une meilleure reproductibilité du test. Ce format permet de plus un dépôt des protéines sondes sur la surface externe des membranes, ce qui est un avantage technique par rapport à une immobilisation en fond de puits, mais aussi pour la lecture des résultats. Ce format de membranes en fond de puits permet également une filtration des échantillons et des différentes solutions à travers celles-ci par application d'un vide (McBride *et al.* 2008). Ce procédé permet de concentrer les solutions dans la membrane, et d'obtenir ainsi un signal spécifique important sur les plots, mais aussi de minimiser le bruit de fond sur la face extérieure en retenant les possibles contaminants à l'intérieur du puits (Figure 5-1).

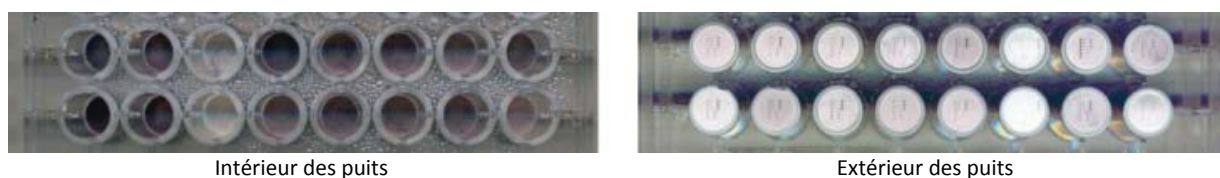


Figure 5-1. Images des membranes sur les deux faces de la plaque 96-puits

Le signal colorimétrique obtenu dans le fond des puits est très important et non-spécifique, tandis que la face externe des membranes, modifiée par la matrice de plots, présente un signal spécifique important sur les plots et peu de bruit de fond.

1.2.2. CHOIX DE LA METHODE DE DETECTION

Dans le but de produire un outil simple, peu coûteux mais performant, une détection des interactions par génération d'un signal colorimétrique semble être la méthode la plus adaptée. La génération d'un signal coloré visible à l'œil nu est facilement mise en œuvre par un couplage des anticorps secondaire à une enzyme : la phosphatase alcaline. La génération du signal prend place dans le protocole robotisé, grâce à l'incubation d'un substrat chromogène sur les membranes. La phosphatase alcaline catalyse alors la transformation du substrat, une solution commerciale de BCIP/NBT de couleur jaune pâle, en un précipité violet qui reste ancré dans la membrane à la position exacte à laquelle il est généré, associé donc à la position d'un plot. Détectable à la surface des membranes à la position d'un plot donné, ce signal témoigne donc de l'interaction sonde antigénique/anticorps cible/anticorps secondaire. L'apparition de ce précipité observable directement après incubation et pour des puits différents réduit les risques d'erreurs pour le traitement des données obtenues : les résultats pour un échantillon sont réunis sur une membrane clairement identifiable, et les plots colorés attestent de la réussite du protocole. L'image de la face inférieure des membranes étant acquise par un scanner de bureau classique, et traitée informatiquement à l'aide de logiciels simples d'utilisation, les coûts sont encore réduits par rapport à d'autres méthodes nécessitant un matériel plus spécifique, et ces procédés sont suffisamment faciles à mettre en œuvre pour que ces puces soient utilisées à grande échelle. Un autre avantage, lié à ces méthodes d'analyse des résultats, consiste en la possibilité de les sauvegarder facilement par informatique, ce qui permet un meilleur suivi du patient.

2. APPLICATION 1 : LE DIAGNOSTIC DES ALLERGIES

2.1. ETUDE PRELIMINAIRE : OPTIMISATION DES PARAMETRES

L'utilisation d'une puce à protéines pour le diagnostic implique différentes étapes clés, dont les caractéristiques doivent être optimisées afin d'obtenir un résultat interprétable, fiable et reproductible.

La première étape importante repose sur le choix des protéines sondes. Pour un essai sur puces à allergènes, le choix s'est porté sur des protéines recombinantes et des extraits caractéristiques de différentes classes d'allergènes : issus de pomme, de cerise, de noisette et de pollen de bouleau. Ces allergènes ont été choisis en se basant sur la caractérisation préalable des échantillons de sérums disponibles par test ImmunoCAP. En effet, il s'agit de sérums de patients présentant une allergie à ces différents composés, contenant donc des IgE dirigés spécifiquement contre une ou plusieurs de ces protéines. Les résultats de test ImmunoCAP pour ces protéines et pour les sérums des mêmes patients nous ont été communiqués par le Dr. Stephan Scheurer, de l'Institut Paul Ehrlich (Allemagne) de façon à pouvoir effectuer une comparaison précise.

Différents paramètres ont ensuite été optimisés, au niveau de la préparation de la puce puis du test immunologique en lui-même. Le volume des solutions de sondes déposé (protéines recombinantes et extraits) a été choisi de façon à garantir une densité optimale de protéine sur la membrane et ainsi obtenir une capacité d'interaction et de signal émis maximal. Pour les tests effectués, les solutions d'allergènes ont été utilisées à des concentrations arbitraires, maximales par rapport aux solutions stocks reçues, et différentes pour chacune d'entre elles. Ceci ne faussera pas l'interprétation des résultats puisqu'ils seront normalisés de façon à être comparés allergène par allergène. Lors de l'étape d'utilisation de la puce pour le diagnostic d'échantillons de sérum, la concentration des sérums, des anticorps secondaires ainsi que les différents temps d'incubation ont été sujets à optimisation au fur et à mesure des essais. Un exemple de l'effet de l'optimisation sur le résultat obtenu sur les membranes est présenté Figure 5-2.

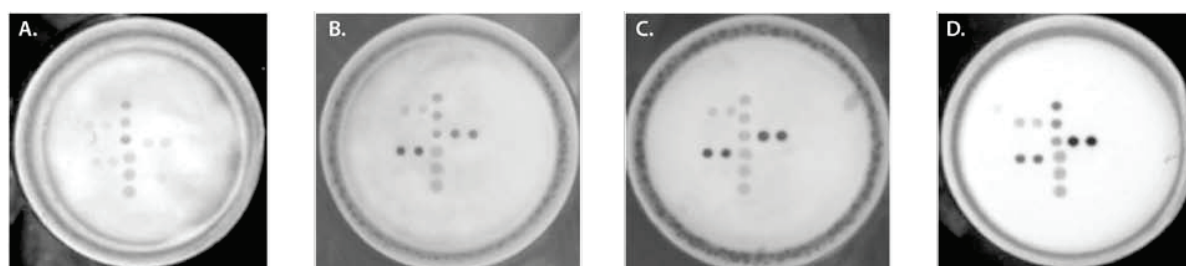


Figure 5-2. Image des membranes obtenues suite à l'optimisation de différents paramètres

A : résultats obtenus dans les conditions utilisées lors des premiers tests (dilution de l'échantillon : 1/20e, concentration en anticorps secondaires : 0,6 µg/mL, temps d'incubation : 10 minutes, temps de révélation : 30 minutes) B : résultats obtenus en changeant la dilution de l'échantillon de sérum et la concentration en anticorps secondaires (1/10e et 1,2 µg/mL respectivement). C : résultats obtenus en augmentant le temps d'incubation des échantillons (30 minutes). D : résultats obtenus en diminuant le temps de révélation (10 minutes)

2.2. DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE A PROTEINE POUR LE DIAGNOSTIC DES ALLERGIES

Les résultats obtenus lors de cette étude sont décrits dans l'article suivant

❖ Article 1. MULTIPURPOSE HIGH-THROUGHPUT FILTERING MICROARRAYS (HiFi) FOR DNA AND PROTEIN ASSAYS

Gaelle C. Le Goff, Cloé Desmet, Jean-Charles Brès, Dominique Rigal, Loïc J.
Blum et Christophe A. Marquette

Biosensors and Bioelectronics, 2010, 26, 1142 – 1151

Cet article traite du développement d'un outil pour l'analyse multiparamétrique et haut-débit d'échantillon de sérum, basé sur un format de plaque filtrante décrit dans les paragraphes précédents. Deux applications ont été étudiées ici, la première concernant le génotypage erythrocytaire (thèse de G. Le Goff), et la seconde le diagnostic des allergies. La seconde application fait l'objet de cette partie de la thèse.

Le protocole de test comprend trois parties. Le dépôt des sondes allergènes selon une matrice de plots, la mise en présence de la puce avec les échantillons de sérum et des anticorps secondaires marqués et enfin la quantification des résultats, associée à la comparaison avec des résultats obtenus par analyse des mêmes sérums à l'aide des tests ImmunoCAP de référence (Phadia). Ce test permet de répartir les échantillons selon différentes classes, suivant leur sensibilité à un allergène donné, comme le montre le Tableau 5-1 (Fall *et al.* 2002).

Tableau 5-1. Correspondance des classes ImmunoCAP

	Correspondance en kU/L	Réactivité associée
Classe 0	inferieur à 0,35 kU/L	réactivité nulle
Classe 1	de 0,35 à 0,70 kU/L	réactivité faible
Classe 2	de 0,70 à 3,5 kU/L	réactivité modérée
Classe 3	de 3,5 à 17,5 kU/L	réactivité forte
Classe 4	de 17,5 à 50,0 kU/L	réactivité très forte
Classe 5	de 50,0 à 100 kU/L	réactivité très forte
Classe 6	supérieur à 100 kU/L	réactivité très forte

Les échantillons de sérum de sept patients ayant connu des épisodes allergiques ont été utilisés, ainsi qu'un échantillon de sérum d'un patient n'ayant jamais eu de réaction de ce type. Les résultats obtenus ont permis tout d'abord de constater des différences au niveau des profils de réactivité pour les différents échantillons. Après normalisation et conversion des intensités de niveau de gris en échelle

CAPUnit, la réactivité a été comparée à celle préalablement déterminée par test ImmunoCAP (Tableau 5-2).

Tableau 5-2. Comparaison des résultats obtenus sur puce à allergène et par test ImmunoCAP

	Pomme				Cerise						Pollen de bouleau		Noisette	
	rMal d3		rMal d4		rPru av1		rPru av3		rPru av4		rBet v1		rCor a1	
	Puce	CAP	Puce	CAP	Puce	CAP	Puce	CAP	Puce	CAP	Puce	CAP	Puce	CAP
Patient 1	3	1	2	0	2	2	0	0	2	0	5/6	5/6	5	5
Patient 2	3	3	0	2	2	2	3	3	0	2	4	4	2	3
Patient 3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	4	4	4
Patient 4	3	3	3	3	1	0	4	4	3	3	4	4	2	3
Patient 5	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	4	4	4	4
Patient 6	0	0	3	3	2	2	2	0	2	3	4	4	4	3
Patient 7	0	1	3	0	3	3	0	2	2	1	4	4	4	4
Patient 8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0

Sont présentés dans ce tableau les résultats exprimés en CAPUnit des signaux obtenus sur puce lors de l'analyse de 8 sérums de patients sur les protéines rMal d3, rMal d4, rPru av1, rPru av3, rPru av4, rBet v1, rCor a1, en comparaison avec les résultats donnés par test ImmunoCAP. En vert apparaissent les résultats concordant exactement entre les deux méthodes, en orange sont représentés les résultats proches.

Les plots correspondant à l'extrait de pomme, à l'extrait de cerise, et à la protéine recombinante rMald1 ont permis d'obtenir des résultats très faibles uniquement, ces sondes ont donc été éliminées de l'interprétation. Pour l'ensemble des paramètres, seuls 63 % correspondent exactement à la classe déterminée par test ImmunoCAP. Néanmoins, pour les classes les plus réactives (4 à 6), les deux types d'analyses ont fourni des résultats très similaires, avec 92% de concordance des classes (12 résultats sur 13). La plus faible corrélation, observée pour les classes les moins réactives, peut être expliquée par le fait que la détermination de la classe est basée sur une échelle CAPUnit qui augmente exponentiellement. De ce fait, les valeurs obtenues pour les échantillons correspondant à des classes 1, 2 et 3 sont très proches en comparaison avec celles des classes 4, 5 et 6. La plus faible sensibilité du test sur biopuce rend donc plus délicate la différenciation entre les classes les moins réactives. Cependant, sur l'ensemble des résultats, un seul est totalement discordant, avec une absence de signal sur la puce pour un sérum déterminé hautement réactif par ImmunoCAP. Pour les deux protéines recombinantes sondes présentant les signaux les plus importants, une comparaison quantitative a été réalisée afin de valider la corrélation entre les deux méthodes. Les coefficients de corrélation des régressions linéaires calculés permettent d'affirmer une bonne corrélation pour ces sondes, avec notamment un coefficient de 0,93 pour rCor a1. Les résultats des échantillons les moins réactifs sont responsables de la perte de fiabilité.

L'étape d'immobilisation de biomolécules sur le support membranaire de la puce a pu être validée grâce à cette étude, ainsi que la détection d'anticorps dans un échantillon. L'outil d'analyse multiparamétrique développé ici pour la détection d'IgE spécifiques de différents allergènes s'est donc révélé être assez performant, bien qu'il présente des lacunes dues à un manque de sensibilité. L'amélioration des

performances pourrait être envisagée à l'aide d'un test à plus grande échelle, avec un plus grand nombre d'échantillons de sérum.



Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays[☆]

Gaelle C. Le Goff^a, Cloé Desmet^a, Jean-Charles Brès^b, Dominique Rigal^b,
Loïc J. Blum^a, Christophe A. Marquette^{a,*}

^a Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE - 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France

^b Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2010

Received in revised form 21 June 2010

Accepted 28 June 2010

Keywords:

Allergy
Blood genotyping
Filtration assay
High-throughput
Microarrays
Multiparametric

ABSTRACT

We are reporting here a low cost colorimetric device for high-throughput multiplexed blood group genotyping and allergy diagnosis, displayed as an automated 96-well microtiter plate format. A porous polymeric membrane sealed at the bottom of each well accounts for the sensor support. For each sensing unit, a 6 × 6 matrix of specific probes is spotted on the external surface of the membrane resulting in 5 mm² microarrays. Thanks to the membrane porosity, reagents dispensed into the well can be eliminated through vacuum soaking. This unusual design drastically reduces the assay background signal.

The system was first validated on robust models composed of either two complementary oligonucleotide sequences or one allergen/specific rabbit IgG pair. The quality of both oligonucleotide and protein immobilisation on the membrane substrate was then demonstrated together with the capacity to use the arrayed biomolecules as probes for the quantitative detection of specific targets (respectively complementary oligonucleotide and specific antibody).

On the basis of these good results, two multiplex assays were developed for crude biological samples testing, focussing on two human in vitro diagnosis applications: a hybridisation assay for multiplex blood group genotyping and a multiparametric immunoassay for allergy diagnosis. In both cases, the transfer to crude biological samples testing was successful i.e. high signal to noise ratio of the stained membranes, reproducibility and good correlation with results obtained using routine testing procedures.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Expectations of biological analysis have reached a new level of complexity: the diagnostic tests are now required to be multiparametric in order to produce more information within a reduced time. Moreover, the number of samples to test keeps increasing, creating a real need for new high-throughput platforms for multiplex diagnosis. In addition to these technical considerations, the economical and social context reflects a rising demand from health authorities upon cost reduction and improved security of diagnosis/prognosis making tools.

Blood donation testing is an eloquent example of that complexity. The search for blood group antigens, infectious agents, microorganisms and other various analytes requires multiple testing procedures (involving immunoassays as well as nucleic acids assays) on million samples a year (Petrik, 2010). This panel of

targets is constantly expanding with not less than 300 blood group antigens identified as for now (Daniels, 2005), and more than 40 new infectious diseases described during the past generation according to World Health Organisation (WHO Report, 2007b).

With the persistent outburst of microarrays, ideal for multiparametric assays, many diagnostic biosensors have been developed based on that parallelised technology. However, even though many of those testing procedures are scientifically mature, this type of device is still not currently available for the diagnosis laboratories. Indeed, most of existing microarray based systems have been developed in a technological driven context (adapting end-user needs to the technology), creating a gap between end-user and technology.

We have been developing a multipurpose microarray based platform for multiparametric and high-throughput filtration assays (HiFi-assays), dedicated to the characterisation of biological samples at reduced cost and time. Combining the multiparametric performances of microarray technology with a 96-well format standard for robotics, our fully automated diagnostic tool permits very high-throughput processing of both nucleic acid assays and immunoassays, in clinical laboratories conditions.

This device is based on a classical 96-well microtiter filtration plate (e.g. Multiscreen HTS-HA, Millipore). The polymeric mem-

[☆] Joint Runner up for the 2010 Biosensors and Bioelectronics Award for most original contribution to the Congress.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 43 14 84; fax: +33 4 72 44 79 70.

E-mail addresses: christophe.marquette@univ-lyon1.fr,
christophe.marquette@axoscience.com (C.A. Marquette).

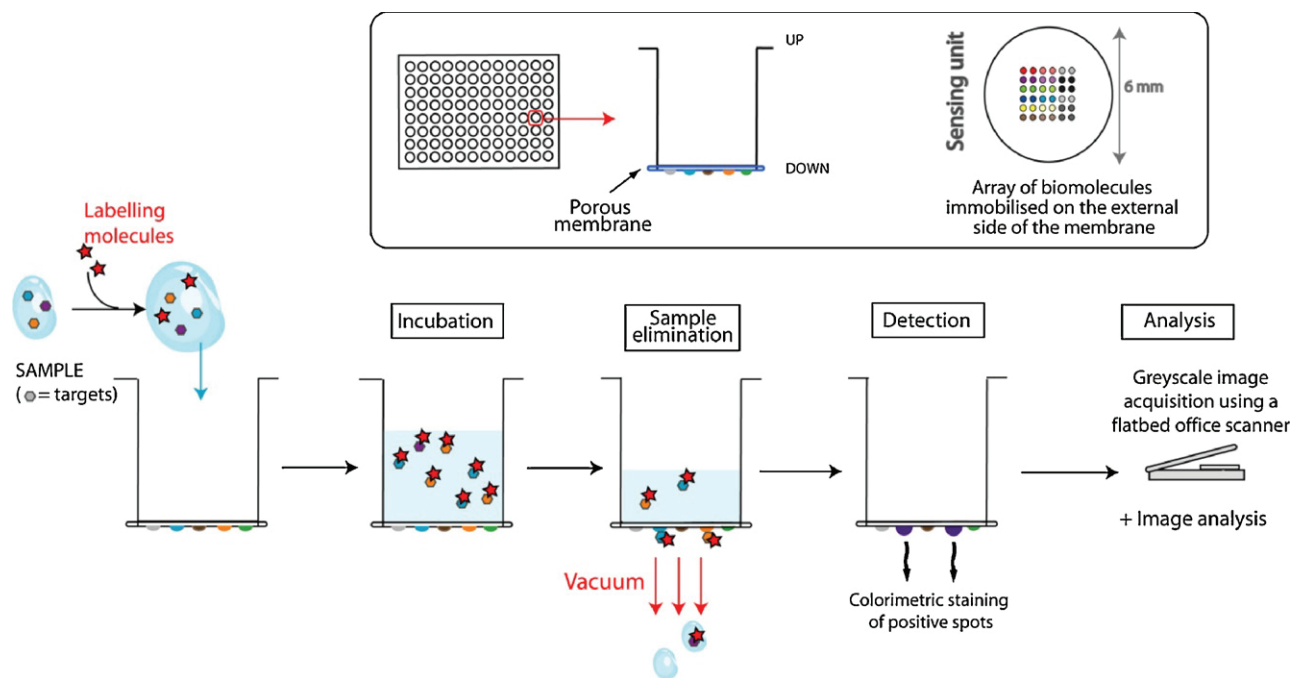


Fig. 1. HiFi-plate design and HiFi-assay filtering protocol. Probe molecules can be oligonucleotides as well as proteins or antibodies. HiFi-assays are based on a filtering protocol: thanks to vacuum soaking, reagents dispensed in wells are loaded through the membrane bottom. After staining of the positive spots, a greyscale image of the membrane bottom is acquired with a simple office scanner and analysed.

brane (mixed cellulose ester) sealed at the bottom of each well enables to eliminate reagents thanks to vacuum soaking. However, in HiFi-plates the membrane is not only used as a filter, but also as support for the immobilisation of an array of biomolecules, which constitutes the multiparametric sensing unit (Fig. 1). The distinctive feature of the plate is the immobilisation of probes on the backside of the membrane, and not inside the well as usually done (Perrin et al., 2003). To our knowledge, this non-conventional design was only mentioned once in the literature for chemiluminescent immunoassays (McBride et al., 2008).

It will be demonstrated how various biomolecules, such as oligonucleotides and proteins, can be immobilised on the substrate as medium density arrays, depending on the application and the target analyte. Our first interest was in the immobilisation of oligonucleotides on the membrane-bottomed plate in order to elaborate a multiplex blood group genotyping tool. In a second time, we successfully transferred the technology to protein immobilisation and developed a multiplex immunoassay for allergy diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Synthetic oligonucleotides (Biotin-TTTTTTTTTTTTTT-C₆-NH₂, NH₂-C₆-TTGAGGTGCATGTTGTGCC, Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA and all genotyping probes and primers) were supplied by Eurogentec (Belgium).

Alkaline phosphatase-labelled streptavidin, alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-human IgE antibodies developed in mouse, *Arachis hypogaea* lectin (from peanut) and anti-*A. hypogaea* lectin antibodies developed in rabbit were purchased from Sigma-Aldrich (France). Alkaline phosphatase-labelled anti-rabbit IgG (H+L) antibodies developed in goat were supplied by Jackson Immuno-Research (USA).

Recombinant allergenic proteins (in PBS) from cherry (rPru a4: 0.42 mg mL⁻¹; rPru a1: 1.59 mg mL⁻¹; rPru a3: 1.86 mg mL⁻¹), apple (rMal d1: 0.11 mg mL⁻¹, rMal d3: 0.99 mg mL⁻¹, rMal d4:

1.15 mg mL⁻¹, hazelnut (rCor a1: 0.48 mg mL⁻¹) and birch tree pollen (rBet v1: 0.82 mg mL⁻¹) were kindly provided by Dr. Stephan Scheurer (Paul Ehrlich Institute, Germany) as well as apple (18 µg mL⁻¹) and cherry (419 µg mL⁻¹) extracts and reactive sera.

2.2. General protocol description

HiFi-plate preparation. Original membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen HTS-HA) were purchased from Millipore. When not mentioned, 2.4 nL drops of spotting solutions (pitch = 500 µm) were arrayed on the membrane backside using a BioChip Arrayer BCA1 (Perkin-Elmer).

Automated filtration assay and analyte detection. HiFi filtration assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a plate filtration unit and a heater. The vacuum and the soaking duration were finely controlled in order to generate the most reproducible results. The filtering protocol involved the following steps. (i) The membranes were washed with PBS (100 mmol L⁻¹, pH 7.4) and saturated with PBSTA (PBS added with Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 1% (w/v)). (ii) Meanwhile cocktail solutions of analyte and labelling molecules in PBSTA were pre-incubated on the heater unit. (iii) Samples were then transferred to HiFi-plate microwells and loaded on the membrane for interaction and labelling. (iv) The membranes were washed with veronal saline buffer (100 mmol L⁻¹, pH 8.5). (v) Finally, 200 µL of a BCIP/NBT ready-to-use solution (Sigma-Aldrich) were added per well for signal generation at room temperature (5 min to 1 h). The original colour of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the purple product of the enzymatic reaction precipitates on positive spots.

Image acquisition. The microtiter plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65,535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution.

Data analysis. Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and

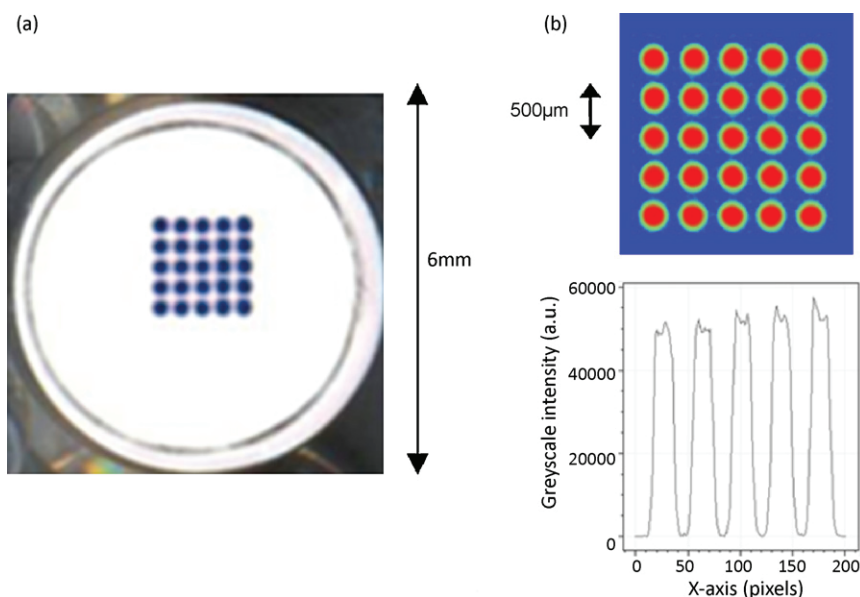


Fig. 2. Array characteristics. 5×5 microarray of replicate spots of a biotinylated 15^{mer} synthetic oligonucleotide (spotting solution: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2.5 nL drops, pitch = $500 \mu\text{m}$). (a) Real colour picture. The membrane bottom was imaged using an office scanner (2400 dpi) after staining of the positive spots. (b) Greyscale intensity image of the entire array (up) and the corresponding profile for one row of spots (down).

corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity on a given probe was calculated as the mean intensity for all replicate spots.

2.3. Synthetic oligonucleotide immobilisation and detection

The synthetic oligonucleotides used as first and second model systems were Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- $\text{C}_6\text{-NH}_2$ and $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTGAGTGCATGTTGTGCC}$ /Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA respectively.

The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 5 min at 50°C ; (iii) incubation on membrane: 10 min at 50°C . Alkaline phosphatase-labelled streptavidin was used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4. Multiplex blood group genotyping

Targeted SNPs selection. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated to 4 minor blood groups (Kell, Kidd, Duffy and MNS) were selected for their clinical relevancy. Those SNPs concern the following mutations and correspond to specific red blood cell surface antigens: Kell: T698C (KEL1/KEL2), T961C (KEL3/KEL4); Kidd: G838A (JK1/JK2); Duffy: G125A (FY1/FY2); MNS: C59T (MNS1/MNS2), T143C (MNS3/MNS4) (Fig. 3).

Whole blood collection. Whole blood samples (EDTA anticoagulant) were collected (with inform consent) from the Etablissement Francais du Sang Rhone-Alpes. Samples were randomly picked among the blood bank and belonged in majority to the Caucasian ethnic group. Selected donors were phenotyped using standard serologic hemagglutination techniques at the Etablissement Francais du Sang Rhone-Alpes.

Probe patterning. Fifteen probes were arrayed on membrane backside forming a 6×6 matrix composed of 12 synthetic oligonucleotide probes (from 17^{mer} to 23^{mer}) specific of the targeted alleles (2 replicates per probe) and 3 control probes (for spotting, hybridisation and negative control; 4 replicates per probe). The spotting procedure (scifLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany) was per-

formed using 2.5 nL drops of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ oligonucleotide solutions in PBS.

Multiplex PCR. Genomic DNA was extracted from the blood sample using a MagNa Pure LC pure robot and the MagNa Pure LC DNA Isolation Kit 1 (Roche Diagnostics). Twelve sequences hosting the 6 target polymorphisms were amplified and labelled using a single 96-well format multiplex PCR on a TProfessional thermal cycler (Biometra, Germany). Forward primers were labelled with biotin at their 5' end. PCR product quality was controlled using electrophoresis (2% agarose gel with 190 V for 20 min).

Filtration assay. The 96-well PCR plates were directly transferred to the EVO75 robot (without further purification) and samples were tested after a 1:5 dilution. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 5 min at 50°C ; (iii) incubation on membrane: 10 min at 50°C . Alkaline phosphatase-labelled streptavidin was used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Genotype assignment. For each SNP associated to the two alleles A_1 and A_2 , the following discrimination parameter P_{score} was evaluated and compared to a set of cut-off values in order to assign genotype.

$$P_{\text{score}} = \frac{I(A_2) - I(A_1)}{I(A_2) + I(A_1)}$$

2.5. Peanut allergen/rabbit IgG monoparametric assays

The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 10 min at 37°C ; (iii) incubation on membrane: 60 min at 37°C . Alkaline phosphatase-labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies were used at a concentration of $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6. Allergy diagnosis multiplex immunoassays

Probe patterning. Twelve different probes were arrayed on the membrane backside resulting in a 37-spot matrix composed of 10 recombinant allergens and extracts (2 replicates per probe) and 2 control probes (WHO reference IgE and an alkaline phosphate-labelled antibody; 3 replicates per probe).

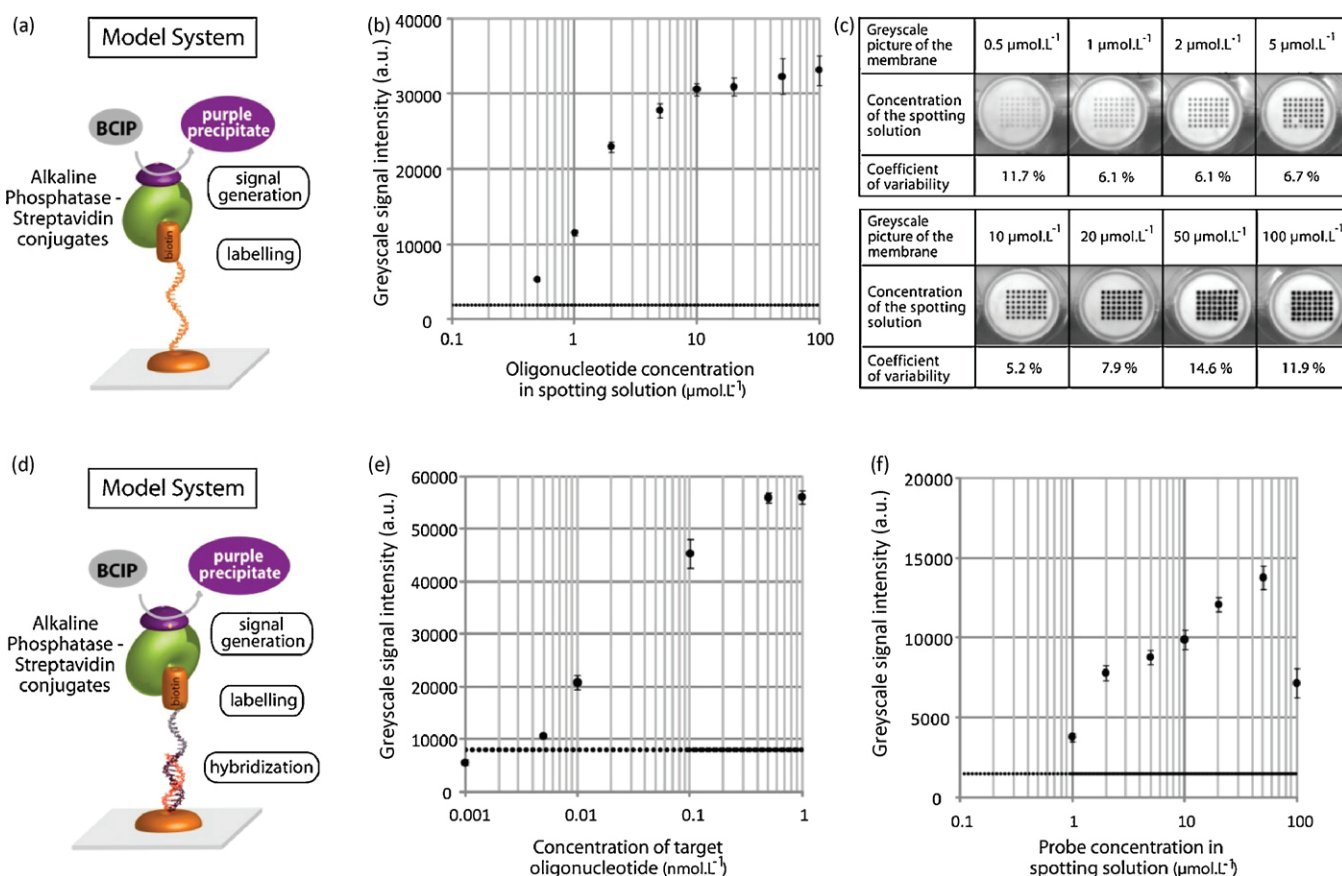


Fig. 3. Influence of probe concentration. For that whole set of experiments, alkaline phosphatase–streptavidin conjugates concentration was $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the spotting pattern was an 8×6 monoparametric matrix (2.4 nL , pitch = $500 \mu\text{m}$). The dot lines indicate limits of detection. Upper part: effect of spotting solution concentration on oligonucleotide immobilisation. (a) The model system: Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- $\text{C}_6\text{-NH}_2$. (b) Spot intensity as a function of the spotting solution concentration. (c) Images of the corresponding stained membranes (greyscale, 2400 dpi). Lower part: hybridisation assays using a couple of synthetic probes. (d) The model system: $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC/Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA}$. (e) Spot intensity as a function of the target concentration (probe concentration = $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). (f) Spot intensity as a function of the probe concentration (target concentration = 2 nmol L^{-1}).

Filtration assay. The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) 1:10 dilution sample pre-incubation: 10 min at 37°C and (iii) incubation on membrane: 60 min at 37°C . Alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-human IgE antibodies were used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3. Results and discussion

Each membrane-bottomed well of Hi-Fi-plate represents a single multiparametric sensing unit, so that processing the whole plate enables to test 96 biological samples simultaneously for multiple parameters. The combination of Hi-Fi-assay's automated filtering protocol and specific layout (backside spotting) is the key to the sensor's efficiency. First of all, the porous membrane (pore diameter = $0.45 \mu\text{m}$) filters dust and micrometer-sized contaminants, which get trapped on its upper surface. Since such particles tend to concentrate the coloured precipitate used for revelation, generating then strong interfering noise signals, this filtration lowers partially the background on the underside of the membrane. Moreover, the filtering protocol enables to avoid the diffusion constrain: during the loading of the sample through vacuum soaking, the analyte molecules are forced to pass through the membrane, which favours the interactions of targets with the immobilised probes and improves the sensor's sensitivity. Finally, the resulting background observed on the membrane underside is lower than the upperside

one and much more homogeneous. In the end, the overall signal appears much "cleaner" under the plate, with a strong specific signal and a homogenous background which facilitates a lot the signal analysis.

The level of interactions on each spot is quantitatively detected through a colorimetric signal generation using alkaline phosphatase labelling. The exposition of the membrane to a BCIP/NBT solution (enzyme substrate) generates a purple precipitate on positive spots (Fig. 2). After this staining step, the microtiter plate bottom can be easily imaged using low cost equipment such as a flatbed office scanner (greyscale imaging, 2400 dpi).

Before developing an assay for complex biological samples, such as blood or sera, preliminary studies were performed in order to optimise the biomolecules immobilisation on the membrane substrate and to investigate the possibility of a quantitative detection of the interaction taking place between target and probe molecules.

3.1. Oligonucleotide immobilisation and detection

In order to investigate the quality of the oligonucleotide immobilisation on the polymeric membrane substrate, synthetic biotinylated oligonucleotides (Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- $\text{C}_6\text{-NH}_2$) were arrayed using a piezoelectric spotter and labelled with streptavidin-alkaline phosphatase conjugates (Fig. 3(a)). Immobilisation did require neither surface pre-treatment nor functionalisation of biomolecules, suggesting a non-covalent interaction with

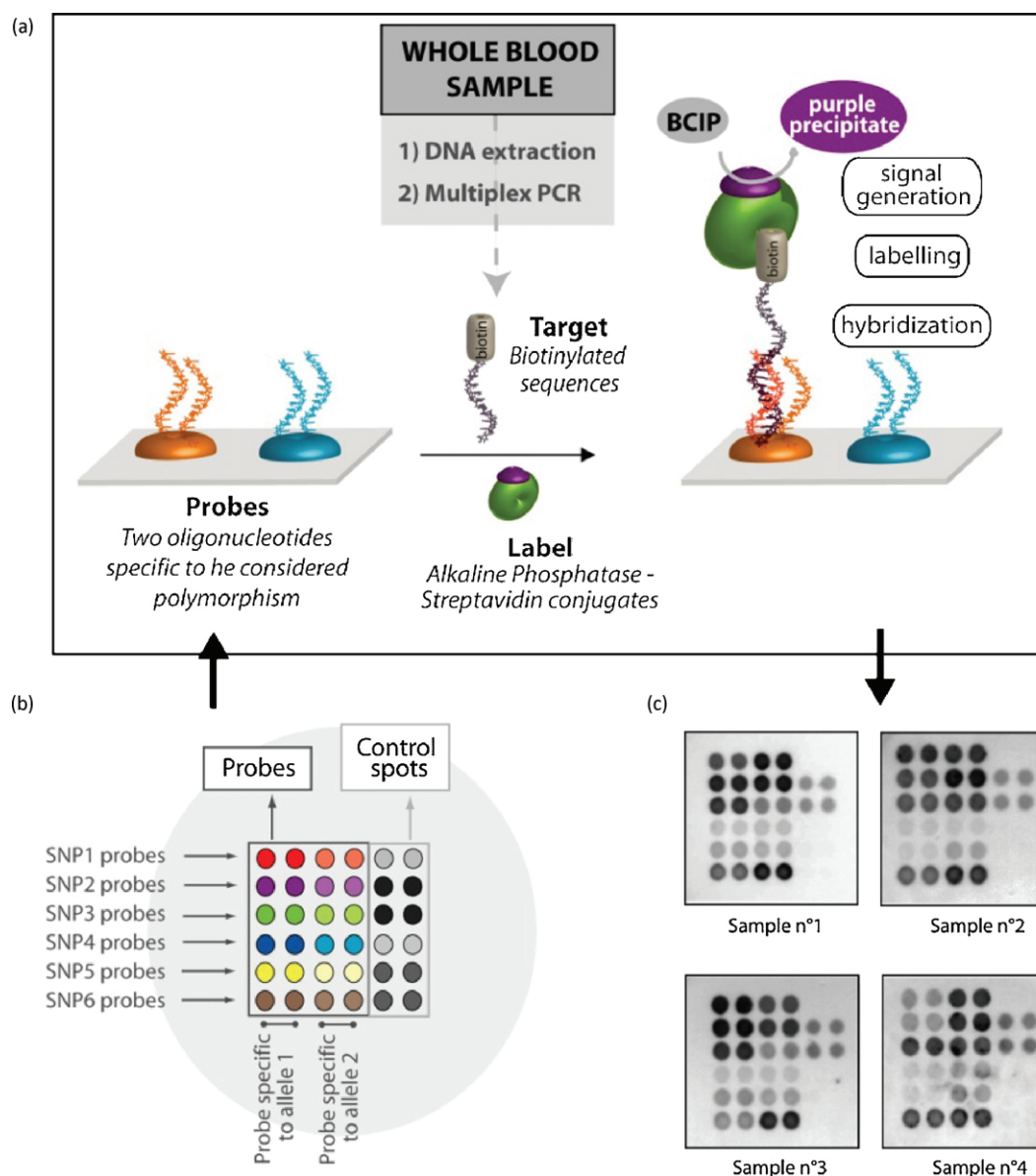


Fig. 4. HiFi-assay for multiplex blood group genotyping. (a) HiFi-assay strategy (simplified scheme: case of a single SNP). (b) Spotting pattern: 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (in PBS) solutions of the 12 specific probes and 3 controls probes were spotted on the membrane (2.4 nL, pitch = 500 μm). (c) Greyscale images of 4 representative stained membranes resulting for 4 different samples testing (2400 dpi).

the substrate. Fig. 2(a) presents a real-colour picture of a stained array of 25 replicate spots.

Oligonucleotides were thus successfully immobilised as medium density microarrays (10–100 spots per well, up to 1000 spots cm^{-2}), with an average spot diameter of $300 \pm 50 \mu\text{m}$. Spots were homogeneous and highly reproducible (Fig. 2(b)) with coefficients of variability yielding between 5 and 10%. The membrane porosity enables a 3D immobilisation of the probes (Supplementary Fig. 1), which results in an increased amount of oligonucleotides per spot and consequently an enhanced sensor sensitivity.

The density of probes arrayed on the membrane can be finely tuned through the control of the spotting parameters. On the one hand, an increase in drop volume results in a stronger signal and a slight enlargement of spot (Supplementary Fig. 2). On the other hand, as shown in Fig. 3(b) and (c), the concentration of spotting solutions can be directly correlated to the probe density in each spot. Indeed, a direct correlation between spotting concentrations and spot signal intensities was observed. The spot signal intensities

increased linearly with the spotting concentration before reaching a plateau for concentrations higher than $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Such a plateau can be explained either by a saturation of the immobilisation sites or by a labelling limitation through steric hindrance between neighbour streptavidins.

On the basis of these good spotting results, monoparametric hybridisation assays were performed in order to evaluate the capacity of quantitatively detect the level of interactions on each spot. In that case, two complementary synthetic oligonucleotide sequences were used as a robust model of probe/target couple. The target oligonucleotide was functionalised with a biotin group acting as an anchor for streptavidin–alkaline phosphatase conjugate (Fig. 3(d)). The apparition of a blue precipitate on a spot indicates that hybridisation took place.

Furthermore, in order to evaluate the effect of probe density on the spot intensities, a constant concentration of target was hybridised on arrays prepared using increasing probe concentrations (Fig. 3(f)). At very high probe concentration in the spotting solution, a very high probe density on the surface leads to a steric

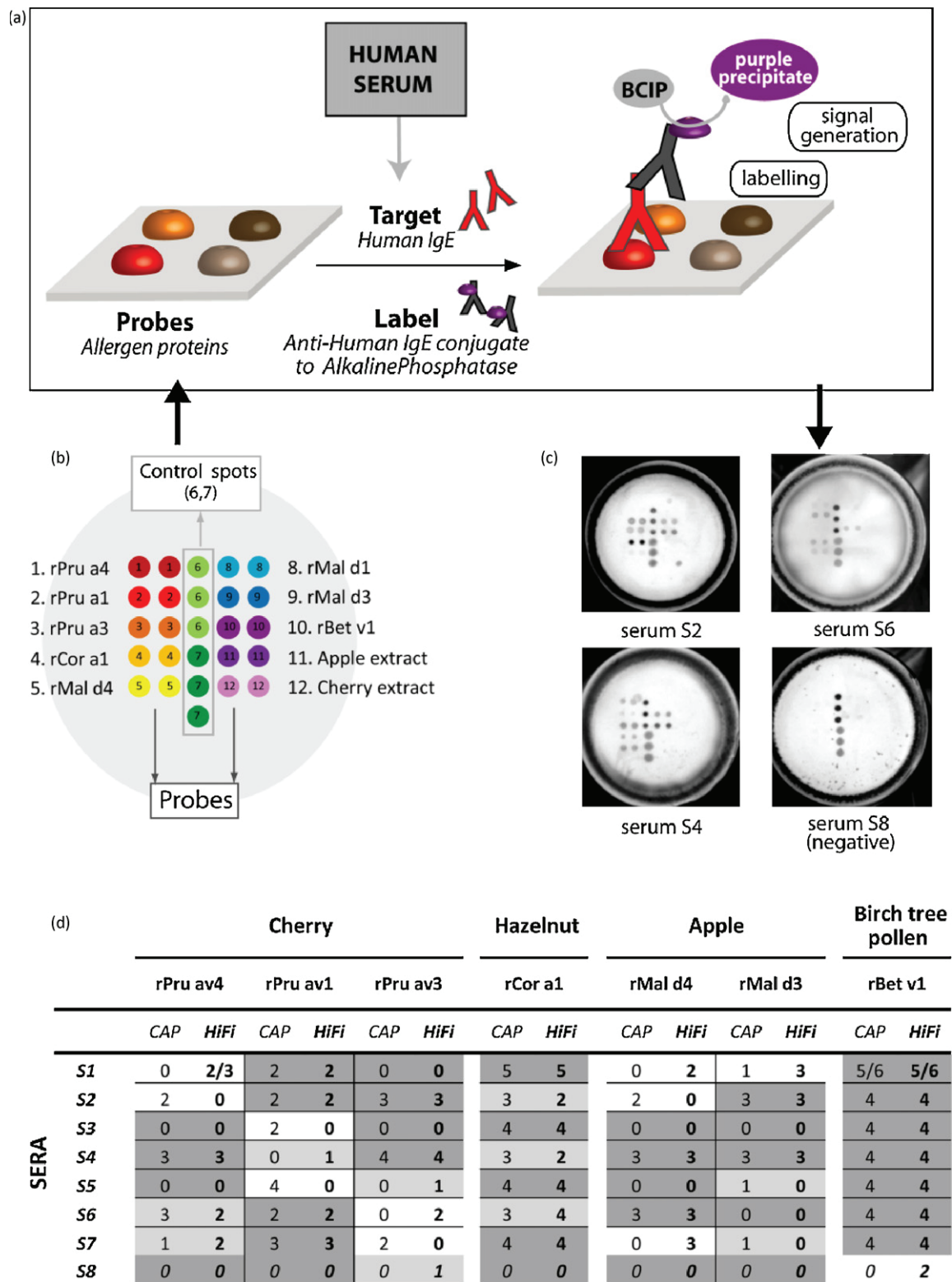


Fig. 5. HiFi-assay for multiplex allergy diagnosis. (a) HiFi-assay strategy for IgE detection in serum. (b) Spotting pattern: 10 specific probes (average concentration = 1 mg mL⁻¹ in PBS) and 2 controls probes were arrayed on the membrane (2.4 nL, pitch = 500 μm). (c) Greyscale pictures (2400 dpi) of 4 representative stained membranes corresponding to 3 allergen-reactive sera (S2, S4 and S6) and a negative serum (S8). (d) Comparison of HiFi-assay results with phenotypes determined by serology on a set of 16 patients. ImmunoCAP classification was used to compare the results of the 2 methods (corresponding reactivities; class 0 absent or undetectable, class 1 low, class 2 moderate, class 3 high, classes 4–6 very high). Specific IgE levels are calculated from CAPunit results as following (Fall et al., 2003): class 0 <0.35 kU L⁻¹; class 1 0.35–0.70 kU L⁻¹; class 2 0.70–3.5 kU L⁻¹; class 3 3.5–17.5 kU L⁻¹; class 4 17.5–50 kU L⁻¹; class 5 50–100 kU L⁻¹; class 6 > 100 kU L⁻¹.

hindrance between single strands resulting in a signal decrease (Ramsay, 1998).

This first raw of results validated both the oligonucleotide immobilisation protocol (with a probe density on the membrane easily tunable) and the quantitative detection of target oligonucleotides. The next step was to use the HiFi-nucleic acids assay for real sample characterisation in developing a reliable tool for multiplex blood group genotyping.

3.2. Application to multiplex blood group genotyping

Blood group typing of patient and donor is a critical step for the prevention of transfusion adverse reactions and blood compatibility can become very challenging in complex cases such as polytransfused patients. If the well-known ABO and Rhesus blood groups are currently typed in routine clinical laboratories, many other minor blood groups (29 blood groups identified) are also associated to clinically relevant red blood cell surface antigens (Quill, 2008). Extension of typing to other blood groups would increase transfusion safety by enabling a better characterisation of blood pouches and consequently a better matching between donor and patient. With average numbers of blood donations of 14 M a year in Europe and 20 M in the US (WHO Report, 2007a), blood qualification centres have to face a high-throughput demand. However, the serologic tests routinely performed in clinical laboratories rely on heavy monoparametric procedures, unsuitable for high-throughput and multiplexing formats (Petrik, 2010).

On the contrary, DNA microarray-based tests were identified as the alternative for bringing multiple blood group typing in blood donation qualification centres (Denomme and Flegel, 2008; Veldhuisen et al., 2009). Most of the already identified blood group antigens are associated to single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Daniels, 2005), i.e. the variation of a unique nucleotide in the sequence of the coding gene. Those SNPs give the possibility to directly identify blood groups at the DNA level, through the determination of patient's genotype, i.e. the identification of the 2 copies of the considered gene displayed in patient's genome. Since each SNP is associated to 2 polymorphic alleles, the patient can exhibit 3 different genotypes: 2 homozygote configurations (2 copies of one allele) and one heterozygote configuration (one of each).

We have been developing a multiplex assay for the genotyping of 4 clinically relevant blood groups (Kell, Kidd, Duffy, MNS) (Poole and Daniels, 2007) associated to 6 single nucleotide polymorphisms. In order to target the sequences specific to the 12 considered alleles, 12 oligonucleotide probes were arrayed on membrane-bottomed wells (2 replicates per probe). For each array, 3 controls probes (4 replicates) completed the 6×6 sensor matrix (Fig. 4(b)). Since the starting material is a whole blood sample, it is necessary to extract genomic DNA and to amplify the target sequences before the hybridisation assay. The 12 target sequences were simultaneously amplified and labelled with a biotin group during a multiplex PCR step. These PCR products were directly dispensed in HiFi-plate wells without further purification. As described in the preliminary studies, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate was used for a colorimetric signal generation on the hybridised spots (Fig. 4(a)). Using a 4-h-protocol duration, 96 whole blood samples can be fully processed on a single plate.

Fig. 4(c) presents 4 typical greyscale images of stained membranes, corresponding to 4 different blood samples. As can be seen, specific reactivity patterns were obtained for each sample. An image of the entirely stained plate is reported in [Supplementary Fig. 3](#).

Ideally, a qualitative test might be sufficient to identify a patient's genotype, a positive coloration appearing only in the presence of the allele in the patient's genome. However, because those

blood group polymorphisms concern a single nucleotide (SNP), a non-negligible percentage of mismatch events occurs, resulting in "false positive" signals. The absence of fully negative result (white spot of probe) in Fig. 4(c) illustrates that fact. To optimise the genotyping efficiency, we investigated the effect of the hybridisation temperature on the match/mismatch signal ratio. The optimal operating temperature was 50 °C. Nevertheless, genotype assignment for each SNP still requires a semi-quantitative analysis performed through a quantitative comparison of the greyscale intensity levels of both alleles. Thus, a P_{score} parameter was calculated for each SNP of each sample (see Section 2) and compared to a set of cut-off values specific to each genotype (data not shown).

In order to evaluate the accuracy of HiFi genotyping assay, parallel serological tests were performed on every sample for phenotype determination. Table 1 compares results from HiFi-assay and serology technique for a set of 16 patients. A phenotype result was deducted from HiFi resulting genotype in order to enable a direct comparison of both techniques. Results were in excellent agreement (98% of concordance) with only 2 discordant results (for MNS blood group system) over 96 distinct parameters. It is likely that the signal weakness of MNS associated probes reduces sensitivity and implies a loss of accuracy.

Multiplex genotyping results were excellent with 100% matching with serological test results for 3 of the studied blood groups and an overall 93% matching for the 4 blood groups. Compared to other commercially available genotyping techniques, HiFi-assay is clearly fitting the blood bank requirements in terms of safety, automation and throughput. Indeed, most of the numerous microarray-based genotyping techniques developed over the past few years (Di Cristofaro et al., 2007; Hashmi et al., 2007; Hopp et al., 2010; Karpasitou et al., 2008) are based on technologies often expensive, seldom easy to handle and difficult to integrate within high-throughput industrial blood supply processes. On the contrary, HiFi-technology main added-value remains its transfer to a fully automated, well-proven and secure high-throughput protocol. This full automation (including genomic DNA extraction, multiplex PCR and filtering hybridisation assay) guarantees that HiFi-technology constitutes a secured and cost-efficient technique for blood qualification centre environment and requires a minimum technician intervention which lowers human error hazard. Besides, the convenient elimination of reagents through vacuum soaking during the filtration assays and the unidirectional fluids handling ensures reduced contamination. Last but not least, the long term stability of the colorimetric staining enables the end-user to store result plates in addition to in silico data storage, leading to better traceability.

3.3. Multiplex allergy diagnosis

Taking advantage of the successful development of the genotyping HiFi-assay, we transferred the technology to protein immobilisation, aiming to develop an immuno HiFi-assay for multiplex allergy diagnosis. Indeed, although classical monoparametric assays such as a classical ELISA and even more the high-capacity solid phase test ImmunoCAP (Phadia(ImmunoCAP(R) InVitroSight TM, 2007)) remain the gold standards for routine allergy diagnosis, recent literature indicates an increasing interest of the field for multiparametric assays based on microarray technologies (Cretich et al., 2009; Fall et al., 2003; Jahn-Schmid et al., 2003; Lebrun et al., 2005; Ott et al., 2008; Tai et al., 2009). Here, HiFi-assay can be a promising candidate thanks to its microarray-based multiparametric format, its high-throughput capacities and its significant background signal reduction obtained from using a filtering protocol. Undeniably, for immunoassays dedicated to the characterisation of crude serum, this last point can be really advantageous.

The immuno HiFi-assay building blocks for the development of an allergy diagnosis tool were here (i) the use of recombi-

nant proteins and crude allergen extracts as arrayed probes for the detection of (ii) allergen-specific immunoglobulins E (IgE) in crude human sera and (iii) a detection of the interaction using a secondary anti-human IgE antibody labelled with alkaline phosphatase (Fig. 5(a)).

In a preliminary study, monoparametric assays were performed on a fully-characterised peanut allergen/rabbit IgG system in order to validate the protein immobilisation protocol and to investigate the possibility of a quantitative immunoassay on the HiFi system. For that purpose, membrane bottomed wells were arrayed with *Arachis hypogaea* lectin (specific peanut allergen) spots and loaded with cocktail solutions composed of anti-*Arachis hypogaea* lectin rabbit IgG at different concentrations and alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-rabbit antibodies. The obtained calibration curve is presented in Supplementary Fig. 4. As observed for oligonucleotide-based assays, coefficients of variability yielded between 5 and 10% and a quantitative correlation between the resulting greyscale signal and the concentration of target molecules was demonstrated. A limit of detection of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of specific antibodies was found with a linear detection ranging over two decades at least.

Given the successful results obtained using the peanut allergen/rabbit IgG system, we proceed with the development of a multiplex array for allergy testing on crude serum samples. A set of recombinant antigens associated to different allergens (birch tree pollen, hazelnut, cherry, apple) and crude allergen extracts (apple, cherry) were arrayed on the membrane (2 replicates per probe, average antigen concentration = 1 mg mL^{-1} in PBS). The spotted matrix was completed by 2 control probes (3 replicates each): a WHO reference IgE and an alkaline phosphatase-labelled antibody as positive control (Fig. 5(b)). Seven patient sera with a positive allergic reaction history and one patient serum without any known sensitivity were loaded on the membrane and incubated at 37°C for 1 hour. The cocktail solution was here composed of 1:10 dilution of patient serum together with anti-human IgE antibodies conjugated to alkaline phosphatase ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Images of 4 representative resulting stained membranes are reported in Fig. 5(c).

As can be seen, specific reactivity patterns were obtained for each sample whereas the control spot signals remained stable. Moreover the image obtained from the control well, loaded with an allergen non-sensitive patient serum, confirms the high specificity of the system. Indeed, for this sample, only the control spots were positively stained. It is also worth noting that as expected, the filtering protocol enables a drastic reduction of the background on the external side on the membrane (see images of membrane bottom and top in Supplementary Fig. 5).

In order to validate the allergy diagnosis potentiality of the immuno HiFi-assay, the greyscale signal of every spot was quantified for each patient. The normalised signals were then converted into CAP unit and compared to the reactivity previously determined using the ImmunoCAP system. Fig. 5(d) presents a comparison of the two methods for a set of 7 allergen-sensitive sera (S1–S7) and one negative serum (S8). Because of the very low signals obtained on apple extract, cherry extract and rMal d1 protein spots, no reliable analysis was performed for those probes. For the full set of parameters, only 63% of the results were matching data from ImmunoCAP testing. However, as a matter of fact, both result sets were in very good agreement (92%) for sera characterised as highly reactive by ImmunoCAP system (classes 4–6). Indeed, within these 3 classes, 12 results over 13 were concordant. The weak correlation observed for low reactivity samples can be explained by the fact that class determination is based on an exponentially increasing CAPUnit scale. Actually, values obtained for class 1, 2 or 3-samples are extremely close in comparison with class 4, 5 and 6 data sets. The lower sensitivity of HiFi-test makes thus difficult the differentiation of class 1, 2 or 3-samples.

Nevertheless, it should be noted that only one parameter was totally misdiagnosed (very different reactivity levels): a negative response was obtained for serum S5 against rPru av 1 allergen, whereas ImmunoCAP characterised that sample as highly reactive.

For rBet v1 (birch tree pollen) and rCor a1 (hazelnut), the two allergens which yielded the highest HiFi signals, a quantitative comparison of both techniques was performed to validate the correlation between the normalised greyscale signal intensity of the spots and the ImmunoCAP system result. Supplementary Fig. 6 presents the correlation plots together with their linear regression. The correlation coefficients of the linear regressions were good, especially for rCor a1 (0.93), even if as explained above, the lower sensitivity of HiFi-assay increases the dispersion of values for weakly reactive samples.

Allergy diagnosis results were very encouraging with 63% matching the gold standard ImmunoCAP assays. Furthermore high correlation (92%) was obtained for highly reactive sera (Classes 4–6) and a quantitative correlation with ImmunoCAP results was demonstrated for two allergens. In addition to the many advantages described above for multiplex blood group genotyping, immuno HiFi-assay main added-value is the drastic reduction of background on the external side of the membrane thanks to the filtering protocol, which is an undeniable advantage for immunoassays dedicated to the characterisation of crude serum.

4. Conclusions

HiFi-technology provides a multipurpose platform for multiparametric high-throughput testing suitable for nucleic acids-based assays as well as immunoassays. Indeed, preliminary studies performed on robust model systems demonstrated (i) the quality of both oligonucleotide and protein immobilisation on the membrane substrate and (ii) the capacity to use the arrayed biomolecules as probes for the quantitative detection of specific targets (respectively complementary oligonucleotide and specific antibody).

Given the successful results obtained during these monoparametric assays, we proceeded with the development of multiplex assays for crude biological samples testing, focussing on two applications for human in vitro diagnosis: a hybridisation assay for multiplex blood group genotyping and a multiparametric immunoassay for allergy diagnosis. In both cases, the transfer to crude biological samples testing was successful i.e. high signal to noise ratio of the stained membranes, reproducibility and good agreement with results obtained using routine testing procedures.

The present report demonstrates proof of protocol for both blood group genotyping and allergy diagnosis assays. Next step will be further validation of assays reliability on a cohort of random patients. The resulting collected information will also be used as a feedback for optimisation of protocols.

Acknowledgments

The authors thank the Blood Donation Qualification Center of Metz-Tessy for whole blood samples providing and extended phenotyping characterisations. The authors thank Dr. Stephan Scheurer (Paul Ehrlich Institute, Germany) for providing of recombinant allergens and sera.

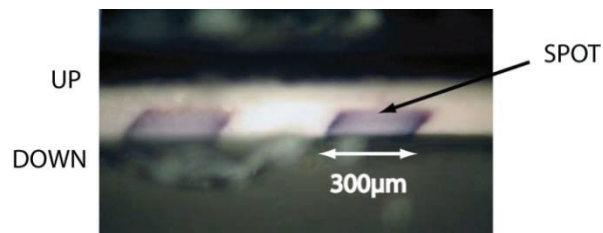
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2010.06.057.

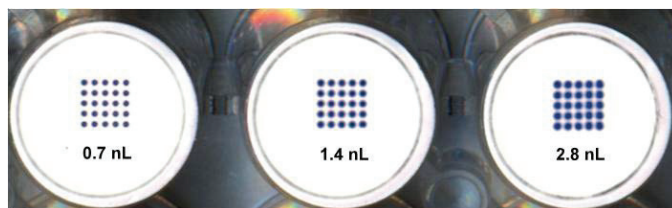
References

- Cretich, M., Di Carlo, G., Giudici, C., Pokoj, S., Lauer, I., Scheurer, S., Chiari, M., 2009. *Proteomics* 9 (8), 2098–2107.
- Daniels, G., 2005. *Transpl. Immunol.* 14, 143–153.
- Denomme, G.A., Flegel, W.A., 2008. *Transfusion* 48 (11), 2461–2475.
- Di Cristofaro, J., Silvy, M., Chiaroni, J., Bailly, P., 2007. *J. Mol. Diagn.* 12, 453–460.
- Fall, B.I., Eberlein-Konig, B., Behrendt, H., Niessner, R., Ring, J., Weller, M.G., 2003. *Anal. Chem.* 75 (3), 556–562.
- Hashmi, G., Shariff, T., Zhang, Y., Cristobal, J., Chau, C., Seul, M., Vissavajhala, P., Baldwin, C., Hue-Roye, K., Charles-Pierre, D., Lomas-Francis, C., Reid, M.E., 2007. *Transfusion* 47 (4), 736–747.
- Hopp, K., Weber, K., Bellissimo, D., Johnson, S.T., Pietz, B., 2010. *Transfusion*, 50.
- ImmunoCAP(R) InVitroSight™, 2007. <http://www.immunocapinvitrosight.com/>, last accessed June 2010.
- Jahn-Schmid, B., Harwanegg, C., Hiller, R., Bohle, B., Ebner, C., Scheiner, O., Mueller, M.W., 2003. *Clin. Exp. Allergy* 33 (10), 1443–1449.
- Karapitsou, K., Drago, F., Crespiatico, L., Paccapelo, C., Truglio, F., Frison, S., Scalarnogna, M., Poli, F., 2008. *Transfusion* 48 (3), 505–512.
- Lebrun, S.J., Petchpud, W.N., Hui, A., McLaughlin, C.S., 2005. *J. Immunol. Methods* 300 (1–2), 24–31.
- McBride, J.D., Francis Guy, G., John Fordham, G., Kolind, T., Barcenas-Morales, G., Isenberg, D.A., Swana, M., Delves, P.J., Lund, T., Cree, I.A., Roitt, I.M., 2008. *Clin. Chem.* 54, 883–890.
- Ott, H., Baron, J.M., Heise, R., Ocklenburg, C., Stanzel, S., Merk, H.F., Niggemann, B., Beyer, K., 2008. *Allergy* 63 (11), 1521–1528.
- Perrin, A., Duracher, D., Perret, M., Cleuziat, P., Mandrand, B., 2003. *Anal. Biochem.* 322 (2), 148–155.
- Petrik, J., 2010. *Biologicals* 38, 2–8.
- Poole, J., Daniels, G., 2007. *Transfus. Med. Rev.* 21 (1), 58–71.
- Quill, E., 2008. *Science* 319 (5869), 1478–1479.
- Ramsay, G., 1998. *Nat. Biotechnol.* 16 (1), 40–44.
- Tai, L.W., Tseng, K.Y., Wang, S.T., Chiu, C.C., Kow, C.H., Chang, P., Chen, C., Wang, J.Y., Webster, J.R., 2009. *Anal. Biochem.* 391 (2), 98–105.
- Veldhuisen, B., van der Schoot, C.E., de Haas, M., 2009. *Vox Sang* 97, 198–206.
- World Health Organisation Report, 2007a. World Health Organisation report on global blood safety and availability, 2007. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/index.html>.
- World Health Organisation Report, 2007b. A safer future: global public health security in the 21st century, 2007. www.who.int/whr/2007/en/index.html.

Supplementary information

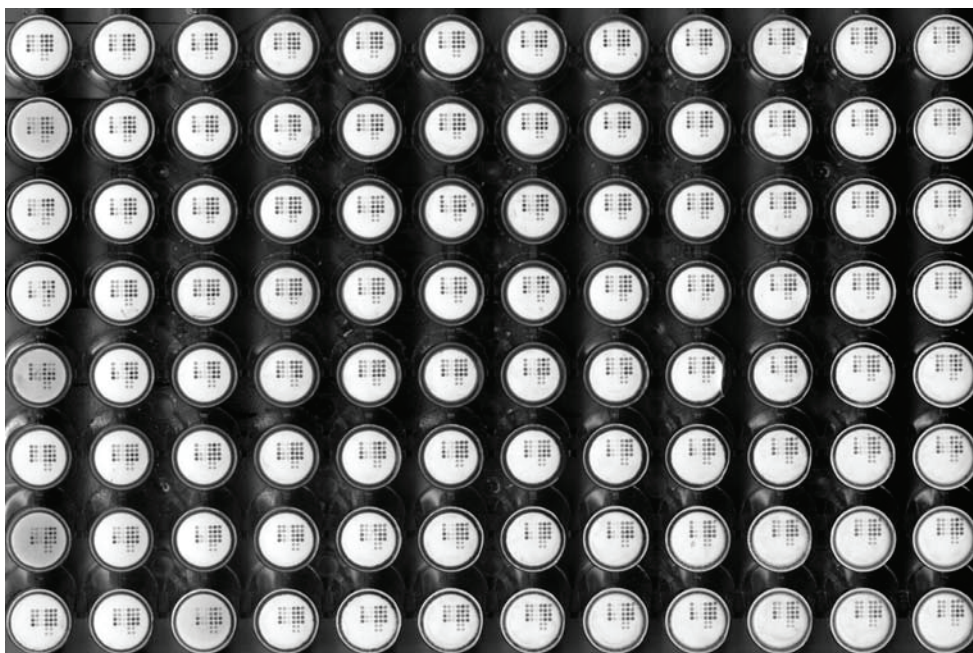


Supplementary Figure 1 | Traversal view of a stained membrane
(real colors optical microscopy picture)

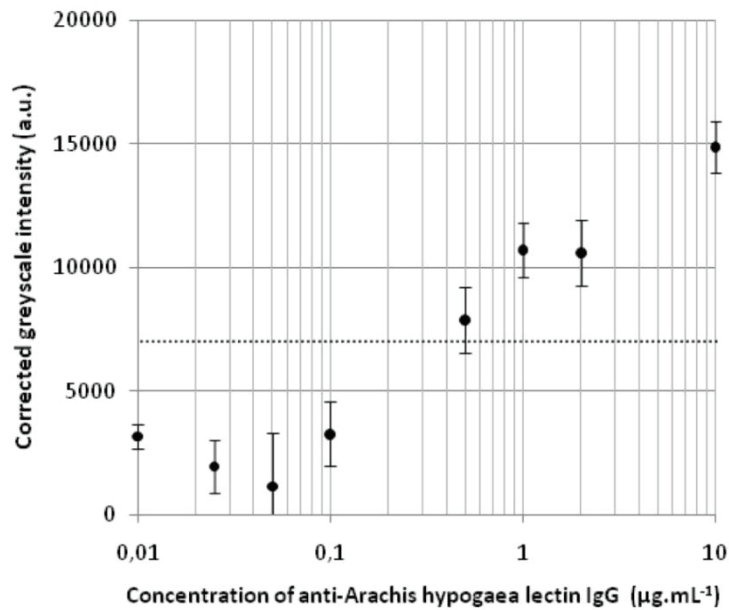


Supplementary Figure 2 | Effect of drop volume on probe density

5*5 microarrays of replicate spots of a biotinylated 15^{mer} synthetic oligonucleotide solution (10µmol.L⁻¹) were spotted with increasing drop volumes (0.7, 1.4 and 2.8nL). The membrane bottom was imaged with an office scanner (2400dpi) after staining of the positive spots (real colours).

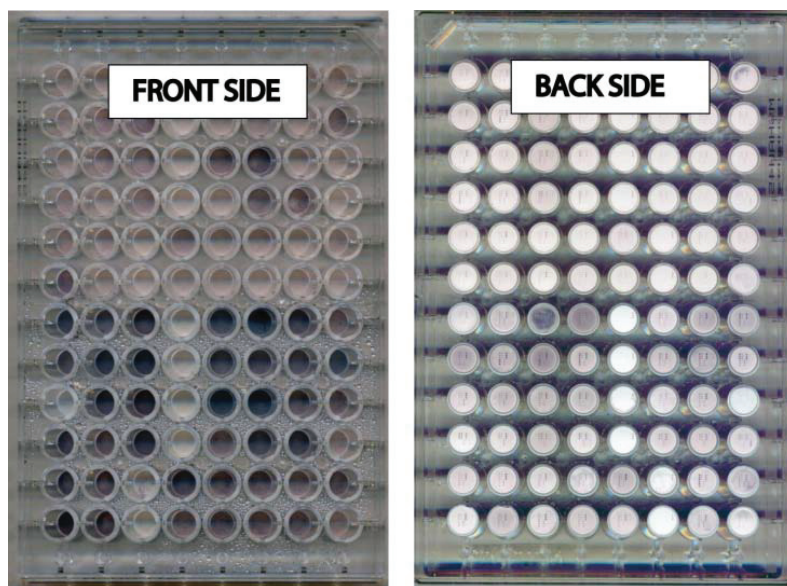


Supplementary Figure 3 | Greyscale picture of a stained HiFi-plate used for blood group genotyping of 96 different patients (2400 dpi)



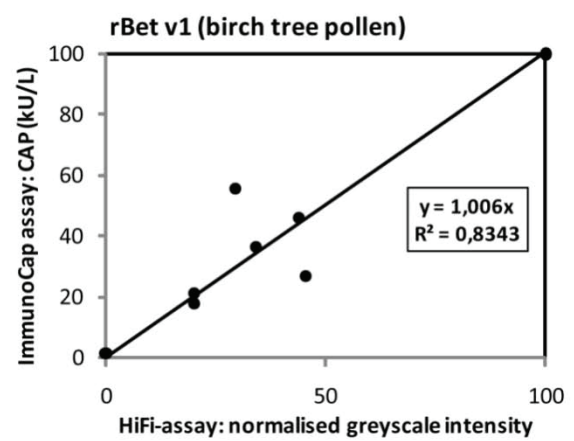
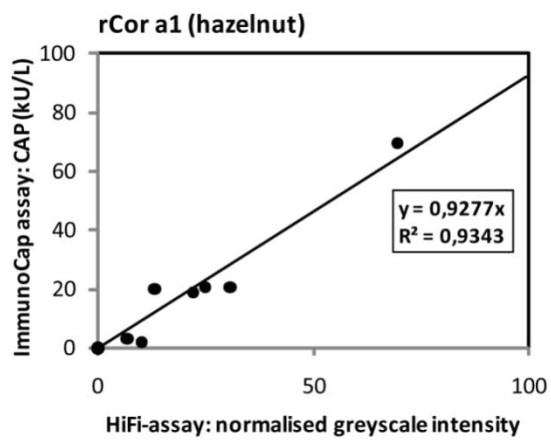
Supplementary Figure 4 | Quantitative detection of peanut allergen/rabbit IgG interaction

The immunoassay was performed using 8*6 arrays of replicates spots of 2.5 nL drops of a 1 mg.mL⁻¹ solution of peanut allergen. Alkaline phosphatase-labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies were used at a concentration of 0.12 µg.mL⁻¹. The dot line indicates limit of detection.



Supplementary Figure 5 | Comparison of background levels on the inside and outside of wells (HiFi-allergy diagnosis assay)

HiFi filtering protocol enables a drastic reduction of background on the external side of the membrane, leading to highly improved signal to noise ratio of the stained membranes.



Supplementary Figure 6 | Correlation between immuno HiFi-assay and ImmunoCAP results for 2 allergens

3. APPLICATION 2 : LE DIAGNOSTIC DU CANCER

L'étude sur le diagnostic d'allergies à l'aide de la puce à protéines développée a permis de valider la possibilité de détecter des anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques dans le sérum de patients. Cette hypothèse a été vérifiée et validée à l'aide de sérum déjà caractérisés, grâce à la comparaison avec les immunotests déjà utilisés en routine. La validation de l'outil développé avec cette première étude permet donc d'envisager son application pour la détection d'autres anticorps, dans des sérums non caractérisés. Pour la seconde application, concernant le diagnostic du cancer, l'outil développé doit permettre la détection d'anticorps associés aux tumeurs dans des échantillons de sérum de patients atteints de cancer. La méthode d'analyse repose sur la comparaison des résultats obtenus pour un ensemble d'antigènes sondes à un panel de références correspondant à des échantillons de sérum de patients sains.

Les auto-anticorps sériques marqueurs de cancer sont majoritairement dirigés contre des protéines qui participent à d'importantes fonctions de la cellule comme la réplication et la transcription de l'ADN, l'épissage de l'ARN, la traduction en protéine et contre des protéines du cycle cellulaire. Ces anticorps sont considérés comme des empreintes immunologiques d'un processus pathologique. Le procédé par lequel les protéines intracellulaires deviennent des cibles des auto-anticorps n'est pas encore clairement connu, mais il a été suggéré que les modifications post-traductionnelles associées à une mort cellulaire anormale pourraient augmenter leur immunogénicité. Une autre hypothèse réside dans la surexpression de certaines protéines dans les tissus affectés, induisant ainsi la perte de la tolérance immunitaire pour ces antigènes. D'autres protéines normalement non exprimées dans un tissu sain, le sont dans les cellules tumorales, c'est le cas de certaines protéines fœtales par exemple. La plupart des antigènes associés aux tumeurs (TAA) sont des protéines cellulaires dont la fonction ou la régulation aberrante peut être liée à la malignité. La nature oncogène de la majorité de ces TAA a conduit à l'hypothèse que les auto-anticorps associés au cancer sont des « rapporteurs » ou des « sentinelles » de l'immunité, identifiant les mécanismes cellulaires aberrants associés à la tumorigénèse (Casiano *et al.* 2006).

La littérature comprend de nombreuses études sur le cancer et ses biomarqueurs, et de nombreuses protéines ont été décrites comme tels. Le choix des sondes TAA pour les puces à diagnostic s'est porté sur 12 protéines présentées comme des marqueurs de plusieurs types de cancer, et souvent retrouvées dans ceux-ci : les cyclines B1 et D1, la PSA, la survivine, p53 et p62, NY-ESO-1, c-myc, Her2/neu, CFH, IMP1 et Koc (Crawford *et al.* 1982, Benmahrez *et al.* 1988, Brawer *et al.* 1992, Lubin *et al.* 1995, Ambrosini *et al.* 1997, Angelopoulou and Diamandis 1997, Covini *et al.* 1997, Ralhan *et al.* 1998, Sandler *et al.* 1998, Doyle *et al.* 2000, Jager *et al.* 2000, McNeel *et al.* 2000, Rohayem *et al.* 2000, Soussi 2000, Horton 2001, Kao *et al.* 2001, Lu *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2003, Megliorino *et al.* 2005, Shi *et al.* 2005, Tureci *et al.* 2006).

3.1. ETUDE PRELIMINAIRE

3.1.1. VALIDATION DES PROTEINES SONDES

Une étude préliminaire a été réalisée avec les antigènes associés aux tumeurs, dans le but de valider des protéines commerciales en tant que sondes, grâce au contrôle de l'accessibilité des protéines sur la membrane. Ces protéines n'ayant pas été testées dans le même contexte (contrairement aux allergènes, d'abord utilisés en ImmunoCAP) leur interaction avec des anticorps spécifiques devaient être vérifiée avant toute analyse sur échantillon de sérum. Pour cela, des solutions d'anticorps anti-TAA (développés chez le lapin et la souris) ont d'abord été utilisées. Seules 9 protéines sur 12 ont pu être testées dans cette pré-étude, du fait de la disponibilité de seulement 9 anticorps correspondants. De cette façon, les anticorps incubés sur la membrane sont connus, et il est possible de vérifier si la présence d'un anticorps particulier permet bien d'obtenir un signal positif sur l'antigène sonde immobilisé, sur lequel il doit normalement se fixer. Ceci permet également une évaluation des réactions croisées avec les autres sondes. La Figure 5-3 illustre les différentes configurations de résultats obtenus.

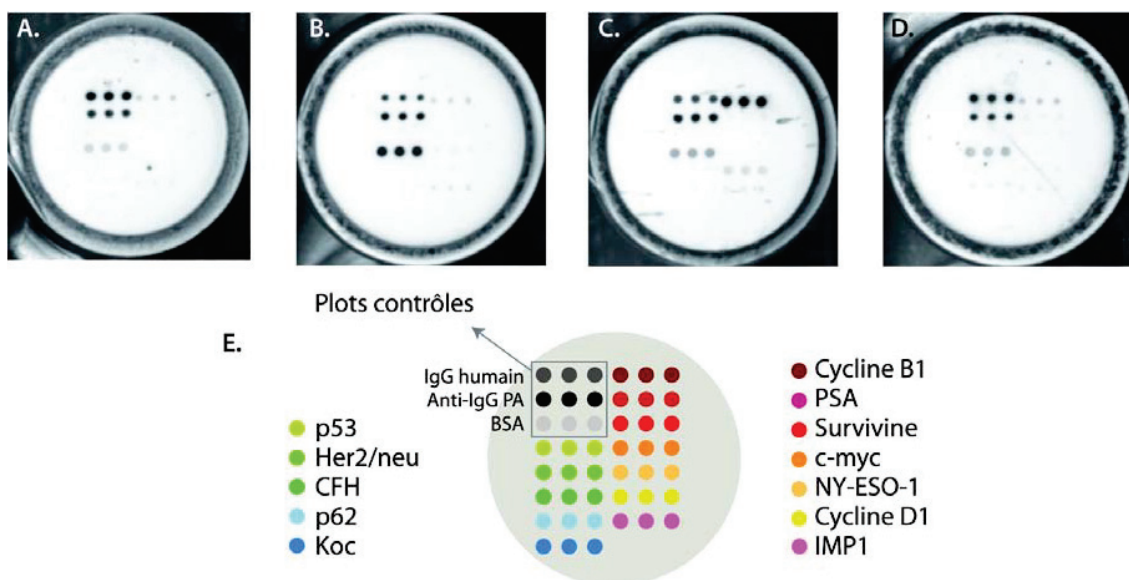


Figure 5-3. Image des membranes obtenues lors des tests de reconnaissance des TAA immobilisés par des solutions d'anticorps commerciaux

A : résultats obtenus sur une membrane n'ayant été incubée avec aucun anticorps primaire. B : résultats obtenus sur une membrane ayant été incubée avec une solution d'anti-p53. C : résultats obtenus sur une membrane ayant été incubée avec une solution d'anti-cycline B1. D : résultats obtenus sur une membrane ayant été incubée avec une solution d'anti-survivine. E : Matrice des sondes

Tout d'abord, il est à noter que la membrane témoin, n'ayant été incubée avec aucun anticorps primaire mais uniquement les anti-IgG de lapin et de souris marqués par la phosphatase alcaline, présente des signaux faibles sur certaines sondes (cyclines B1 et D1, p53) (Figure 5-3A). Les anticorps secondaires se sont donc fixés directement sur certaines protéines sondes. Ces signaux non spécifiques obtenus sur le

témoin seront donc pris en compte lors de l'analyse des membranes ayant été incubées avec des solutions d'anticorps.

Dans le cas des protéines p53, cycline D1, CFH, NY-ESO-1 et PSA, les signaux n'apparaissent que sur la protéine correspondant à l'anticorps ajouté (exemple Figure 5-3B). Ceci nous permet de mettre en évidence une reconnaissance spécifique de l'antigène par l'anticorps. On peut donc penser que la protéine sonde déposée sur la membrane a conservé sa conformation, ou tout au moins que les sites de reconnaissance sont accessibles à l'anticorps. Les protéines en question ont donc été validées pour la reconnaissance d'anticorps sériques sur puce multiplexée, et sélectionnées pour la suite de l'étude.

Un autre cas se présente pour la protéine cycline B1 (Figure 5-3C). L'ajout d'anticorps anti-cycline B1 génère un signal fort pour cette sonde, mais aussi, plus faiblement pour d'autres TAA (p53, ainsi que Her2/neu). Dans ce cas, une réactivité croisée est clairement mise en évidence, il sera donc nécessaire de tenir compte de celle-ci lors des tests sur échantillons réels.

Pour les sondes survivine, c-myc et Her2/neu quelles que soient les conditions utilisées, aucun signal n'est obtenu (exemple Figure 5-3D). Ici, trois raisons peuvent être avancées : soit une perte de conformation de la sonde, le site de reconnaissance étant alors masqué ou détruit, soit l'anticorps commercial utilisé ne possède pas la spécificité nécessaire, soit enfin les anticorps secondaires ne reconnaissent pas de manière efficace les anti-survivine, c-myc et Her2/neu. De façon à vérifier la dernière hypothèse, une étude des interactions entre les anticorps primaires et secondaires a été mise en œuvre.

Les anticorps correspondant à chaque TAA ont été déposés sur les membranes, puis incubés avec les solutions d'anticorps secondaires marqués. Toutes les sondes ont permis d'obtenir un signal d'interaction. L'absence de signal précédemment observée pour la survivine, c-myc et Her2/neu n'est donc pas due à l'absence de reconnaissance des anticorps par les anticorps secondaires, mais bien à l'absence d'interaction entre l'antigène sonde et l'anticorps cible. Deux nouvelles sources de protéines (survivine et c-myc) ont alors été testées. Dans cette nouvelle configuration, un signal de reconnaissance spécifique a été obtenu, validant l'accessibilité et la réactivité des deux protéines.

Ainsi, sur les 9 protéines testées, 8 ont été validées de manière définitive quant à leur capacité à être reconnue par des anticorps spécifiques. Bien que cette étude préliminaire ne nous permette pas d'être totalement sûrs que les sondes seront reconnues spécifiquement par leur anticorps sérique, elle nous a permis d'éliminer deux protéines commerciales et de les remplacer (survivine et c-myc). De plus, elle apporte des indications qui pourraient nous permettre de comprendre une absence constante de signal, sur Her2/neu par exemple, lors des tests réalisés sur échantillons réels.

3.1.2. OPTIMISATION DES PARAMETRES PRINCIPAUX

Les tests avec des échantillons de sérum ont été effectués en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang, fournissant les sérums de patients sains et de patients atteints de différents types de cancers. Les résultats initialement obtenus en utilisant le même protocole que pour les puces à allergènes ne permettaient pas le traitement habituel des données, en effet, le bruit de fond était très important sur

l'ensemble des membranes, et les signaux très faibles (Figure 5-4A). Suite à cela, un protocole en deux étapes a été choisi : l'incubation des sérums seuls sur les membranes d'abord, puis l'incubation des anticorps secondaires. En effet, la concentration totale d'IgG étant très importante dans le sérum, lorsqu'on pré-incube celui-ci avec les anticorps secondaires anti-IgG, la proportion d'anti-IgG se fixant aux IgG anti-TAA est faible, ce qui résulte en un faible signal par rapport au bruit de fond. En incubant d'abord les sérums et en effectuant un lavage qui permet d'éliminer les protéines non fixées, seuls les IgG anti-TAA seront présents sur la membrane, ainsi disponibles pour interagir avec les anti-IgG.

Un nouvel essai a donc été réalisé, afin de tester d'une part ce protocole en deux étapes, mais également différentes concentrations d'anticorps secondaires (Figure 5-4B). A partir des images obtenues, une concentration de 0,12 µg/mL pour les anticorps secondaires a été choisie, celle-ci permettant d'obtenir les signaux spécifiques les plus forts pour un bruit de fond minimal.

Afin d'augmenter les possibilités d'interaction sonde/cible et complexe/anticorps secondaires, les temps d'incubation ont été allongés à 1 heure à 37°C. Le signal est une nouvelle fois augmenté, mais cette fois-ci l'augmentation s'accompagne d'un bruit de fond important (Figure 5-4C).

Afin de diminuer le bruit de fond, nous avons remplacé les tampons classiques par du tampon LowCross Buffer commercial, dont la composition est optimisée afin de diminuer au maximum les interactions non spécifiques. Ces différents changements nous ont permis de diminuer le bruit de fond de manière significative tout en conservant des signaux spécifiques élevés (Figure 5-4D).

Le protocole optimisé résultant de ces modifications est décrit en détails dans le chapitre Matériels et méthodes, au paragraphe 2.7.2.2, page 149.

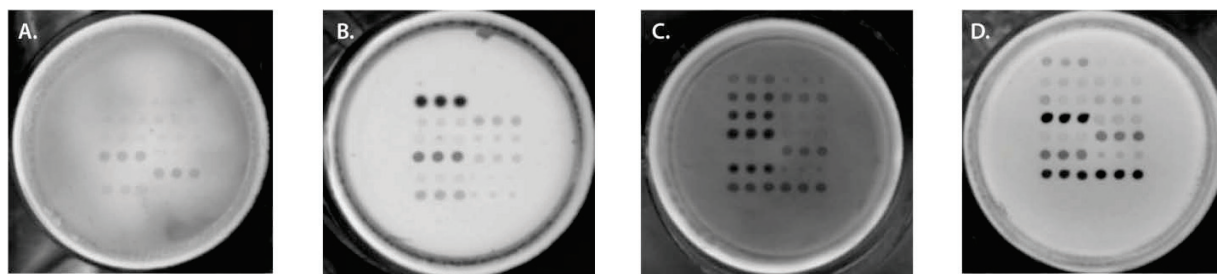


Figure 5-4. Image des membranes obtenues suite à l'optimisation de différents paramètres

A : résultats obtenus en réalisant le protocole en une étape. B : résultats obtenus sur les membranes en réalisant le protocole en deux étapes. C : résultats obtenus sur les membranes en augmentant les temps d'incubation à 1 heure. D : résultats obtenus sur les membranes avec l'utilisation de LowCross Buffer.

3.1.3. CHOIX DE LA DILUTION DE SERUM

Le but de nos essais étant la comparaison des signaux obtenus sur différents échantillons, il est important que la quantité de protéines déposées sur la membrane ne soit pas limitante par rapport à la quantité d'anticorps spécifiques présente dans l'échantillon, de façon à permettre l'évaluation de la différence de concentration de ces anticorps entre des patients sains et des patients malades. En effet, si

les anticorps contenus dans les échantillons sont en concentration saturante, il sera impossible d'observer des différences de signal entre les échantillons. Différentes dilutions de sérum ont donc été réalisées, afin de déterminer la dilution à utiliser.

Le sérum P7, provenant de prélèvements effectués sur un patient atteint du cancer du colon, a été utilisé pour cette étude. Les dilutions testées sont les suivantes : $1/10^e$, $1/20^e$, $1/50^e$, $1/100^e$, $1/500^e$, $1/1000^e$, $1/5000^e$. L'analyse des images des différentes membranes (Figure 5-5) nous a permis de tracer les courbes d'évolution de l'intensité du signal en fonction de la dilution utilisée, et ce pour chaque protéine, un exemple de courbe est présenté sur la Figure 5-6. Les courbes obtenues grâce à la quantification des signaux ont une forme sigmoïdale : aux plus faibles concentrations le signal varie peu avec la dilution. Se présente ensuite une phase où le signal augmente avec la concentration en anticorps, c'est dans cette phase de la courbe qu'il sera nécessaire de se placer pour nos essais. Puis, aux plus fortes concentrations, l'intensité du signal atteint un plateau, la phase de saturation est alors atteinte, tous les sites d'interactions accessibles sont occupés par les anticorps. Cette forme est caractéristique des courbes d'interaction de type ELISA, régie par une constante d'affinité classique. Elles témoignent d'un signal spécifique de reconnaissance et d'interaction.



Figure 5-5. Image des membranes obtenues pour différentes dilutions du sérum P7

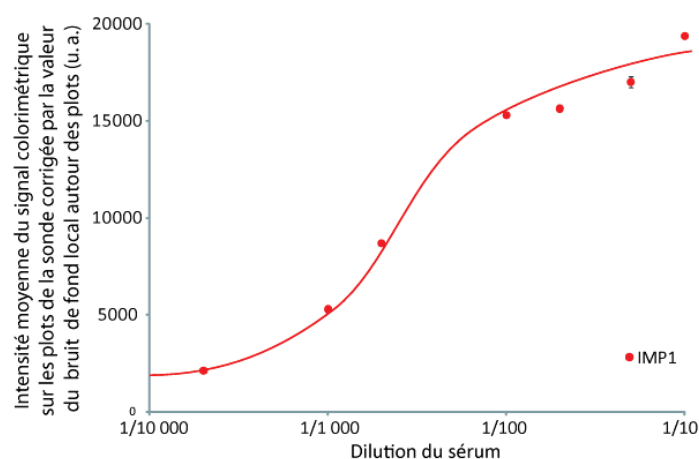


Figure 5-6. Exemple de courbe de l'intensité du signal colorimétrique en fonction de la dilution de l'échantillon de sérum

Pour l'analyse des échantillons de sérum, une dilution de $1/500^e$ sera donc choisie pour laquelle les signaux s'inscrivent dans la phase de croissance des courbes précédentes. Un contrôle à une dilution de $1/2000^e$ sera aussi utilisé afin de vérifier pour chaque échantillon que la phase de saturation n'est pas atteinte.

3.1.4. EVALUATION DE LA REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité des résultats à été testée en reproduisant plusieurs fois le même protocole sur un même échantillon (sérum P7, provenant de prélèvements effectués sur un patient atteint du cancer du colon). L'intensité pour chaque plot a été mesurée en déduisant le bruit de fond local puis moyennée par protéine (barre rouge de la Figure 5-7). Le profil obtenu est constant pour les différents essais, quatre des protéines sondes donnent un signal significatif, et l'on constate que ce signal est assez reproductible, avec des coefficients de variation de l'ordre de 7 % pour ces protéines. De plus, la variabilité entre les réplicats de plots, de l'ordre de 2,2 % en moyenne, est très faible, mettant aussi en évidence une bonne reproductibilité de l'étape de dépôt des sondes.

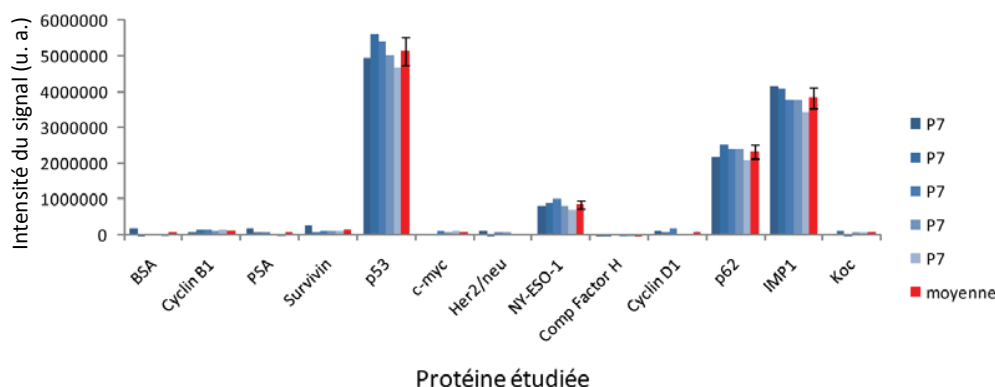


Figure 5-7. Représentation graphique de l'intensité moyenne des signaux obtenus pour chaque sonde lors d'un test de reproductibilité

3.2. DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE A PROTEINE POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER

Les résultats obtenus lors de cette étude sont décrits dans l'article suivant.

❖ Article 2. MULTIPLEXED IMMUNOASSAY FOR THE RAPID DETECTION OF ANTITUMOR-ASSOCIATED ANTIGENS ANTIBODIES

C. Desmet, G. C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum et C. A. Marquette

Analyst, 2011, 136, 2918 – 2924

L'outil d'analyse multiparamétrique développé dans cette étude vise à détecter des auto-anticorps anti-TAA, marqueurs biologiques de cancer, dans des échantillons de sérum. Il repose sur un protocole de test en 3 parties : l'immobilisation des antigènes sondes (les TAAs sélectionnés) sur les membranes supports dans un premier temps, puis la détection de leur interaction avec les anticorps spécifiques présents dans le sérum des patients. Cette étape est réalisée en deux temps, l'incubation des sérums en premier lieu, puis la révélation des interactions basée sur l'utilisation d'anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline. La seconde partie consiste en la quantification des signaux colorimétriques,

et en l'interprétation des résultats par comparaison avec une valeur seuil définie à partir des échantillons de donneurs sains.

L'étude a été réalisée à partir d'échantillons de sérum fournis par l'Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes. Ceux-ci sont issus de prélèvements collectés entre 2003 et 2009 chez 32 patients atteints de cancer du sein ou de la prostate, et chez 16 donneurs sains. Les sérums des donneurs sains ont été utilisés dans un premier temps pour calibrer le système et définir des valeurs seuils. Pour chaque échantillon, la présence d'auto-anticorps spécifiques des TAA immobilisés a été quantifiée à partir du signal colorimétrique obtenu sur chacun des plots. Une valeur seuil a ensuite été définie pour chaque TAA, calculée à partir du signal moyen obtenu pour l'ensemble des échantillons de donneurs sains additionné de 3 écarts types (Zhang *et al.* 2003, Shi *et al.* 2005). Ce traitement statistique permet de définir une valeur seuil sous laquelle les résultats obtenus pour 99,8% des donneurs sains sont situés. Dans un second temps, les échantillons de sérum de patients atteints de cancer ont été analysés à l'aide de la puce. Les signaux ont été quantifiés et les valeurs obtenues comparées aux valeurs seuils pré-déterminées. La classification des échantillons en deux groupes a alors été effectuée, selon leur positivité ou négativité pour chacun des TAAs.

Certains des TAAs sélectionnés ont une valeur prédictive faible (voire nulle) dans le cadre de ce test. En effet, aucun des échantillons n'est déterminé positif pour trois des sondes (PSA, Cycline D1 et Koc), et seul un échantillon pour quatre autres (Survivine, CFH, Her2/neu, p62). En revanche, l'utilisation du panel des cinq autres TAA (p53, c-myc, IMP1, NY-ESO-1 et Cycline B1) permet de déterminer 72,2 % des patients atteints de cancer comme « positifs » en un seul test. Ces données démontrent l'importance de l'utilisation d'un panel de biomarqueurs afin d'augmenter de manière significative la valeur prédictive du test réalisé. Dans le but de rendre ce test plus efficace pour le diagnostic, il serait nécessaire d'améliorer le panel de TAA avec des antigènes complémentaires. De plus, le test d'une population plus large de donneurs sains permettrait un calcul plus précis des valeurs seuils pour chacune des sondes, et rendrait ainsi le diagnostic plus sensible.

Enfin, les patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate n'ont pas été différenciés avec le test tel qu'il a été réalisé ici. En d'autres termes, l'identification d'un profil spécifique du type de cancer n'a pas été possible avec le panel de TAA utilisé. Néanmoins, une perspective intéressante de ce projet pourrait consister à affiner le panel d'antigènes, en sélectionnant des protéines plus spécifiques d'un seul type de cancer. De nombreux marqueurs spécifiques ont déjà été décrits, et ceux-ci pourraient rendre envisageable le diagnostic différencié selon le type de cancer. Enfin, le test de ces marqueurs sur de larges cohortes de patients et de donneurs sains permettrait de déterminer l'efficacité de ces combinaisons de marqueurs comme outil diagnostique.

Analyst

Interdisciplinary detection science

www.rsc.org/analyst

Volume 136 | Number 14 | 21 July 2011 | Pages 2869–3024

Cyclin B1	-----	22.2%
Cyclin D1	-----	0.0%
Complement factor H	---	5.6%
c-myc	-----	1.1%
NY-ESO-1	-----	6.7%
PSA	-----	0.0%

IMP1	-----	27.8%
Her2/neu	-----	5.6%
p53	-----	33.3%
p62	-----	5.6%
Survivin	-----	5.6%
Koc	-----	0.0%



ISSN 0003-2654

RSC Publishing

PAPER

C. A. Marquette *et al.*
Multiplexed immunoassay for the rapid
detection of anti-tumor-associated
antigens antibodies



International Year of
CHEMISTRY
2011



0003-2654 (2011) 136:14;1-8

Cite this: *Analyst*, 2011, **136**, 2918

www.rsc.org/analyst

PAPER

Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies

C. Desmet,^a G. C. Le Goff,^a J.-C. Brès,^b D. Rigal,^b L. J. Blum^a and C. A. Marquette^{*a}

Received 14th February 2011, Accepted 23rd May 2011

DOI: 10.1039/c1an15121e

TAA (tumor-associated antigens) microarrays were designed to detect auto-antibodies directly in patient sera. Twelve different probes were chosen according to their described occurrence in cancer pathologies (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA). Microarrays of these 12 proteins were immobilized within the nitrocellulose/cellulose acetate membrane of a 96-well filtering microtiter plate bottom. The captured auto-antibodies were detected using a staining approach based on alkaline phosphatase labeling. Thus, the presence of specific auto-antibodies in samples was visualized through the positive staining of the corresponding TAA spots. The TAA HiFi microarrays were shown to be able to capture specific purified anti-TAA antibodies. In real samples, 9 proteins from the 12 TAAs panel were shown to generate specific signal and 5 antigens (p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc) were shown to have interaction with more than 10% of the positive sera from cancer patients. This protein subpanel was proven to be able to detect 72.2% of the cancer patients tested (within a 34 panel of 18 patients and 16 healthy donors).

Introduction

Cancer remains the major public health problem in developed countries, after cardiovascular diseases, with currently 25 million persons concerned worldwide. In a 2008 WHO report, the number of incident cases of cancer was estimated to 12.4 million (6.7 million men and 5.7 million women).¹ Within this large patient population, more than 60% lost their fight against cancer, mainly because of late pathology detection.² Indeed, noninvasive tumor diagnoses are usually performed using imaging techniques, really useful for pathology follow-up, but rarely accurate enough to detect tumors in their early development stage.

In order to cope with this issue, oncologists required innovative and noninvasive early detection methods. In this context, cancer molecular diagnosis based on serum profiling is a particularly attractive concept since a single draw of blood would allow the identification of different cancers. Here, tumor-associated antigens (TAAs) are of great interest because their serological or cellular level variations induce auto-immune responses, early during the tumor development.³ Therefore, the detection of aberrant levels of auto-antibodies against TAAs in serum might provide a powerful early diagnosis tool.⁴

Although the mechanisms leading to auto-antibody production in cancer patients are not completely deciphered, the available data show that most TAAs are proteins whose deregulation could lead to tumorigenesis. The most obvious ones are tumor suppressor gene products (p53⁵ and Her2/neu⁶), or cell cycle control proteins (cyclin B1 or cyclin D1), whose auto-immunity has been reported in cancer patients.⁷ Koc, p62 and IMP-1, three proteins containing similar RNA-binding motifs, were identified as well as TAAs since their mRNAs were over-expressed in cancer cells and specific auto-antibodies were detected in patient sera.^{8,9} Other miscellaneous TAAs were also described such as the anti-apoptotic cellular protein survivin,^{10,11} the oncogene product c-myc,^{12,13} the calcium-dependent cell–cell adhesion glycoprotein P-cadherin,¹⁴ the phosphoglycerate kinase-1,¹⁵ the prostate specific antigen^{16,17} and the differentiation and cancer testis antigen NY-ESO-1.¹⁸

Each of these auto-antibodies can be detected in patients' sera using monoparametric immunoassays such as the traditional ELISA.^{19,20} This classical approach was used to demonstrate the diagnosis benefit of the concept. However, working routinely with single parameter format assays would be highly expensive and time consuming for clinicians since each specific antibody will have to be measured in a separate assay. Furthermore, the number of samples to analyze is constantly increased, generating a real demand for new multiplex and high-throughput assay tools. Recently, our group proposed a cost effective solution to overcome such issues using a multipurpose microarray based platform for multiparametric and high-throughput filtration assays (HiFi-assays) (Fig. 1).²¹ Combining the multiparametric

^aEquipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1—CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE—43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; christophe.marquette@axoscience.com

^bEtablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Lyon, France

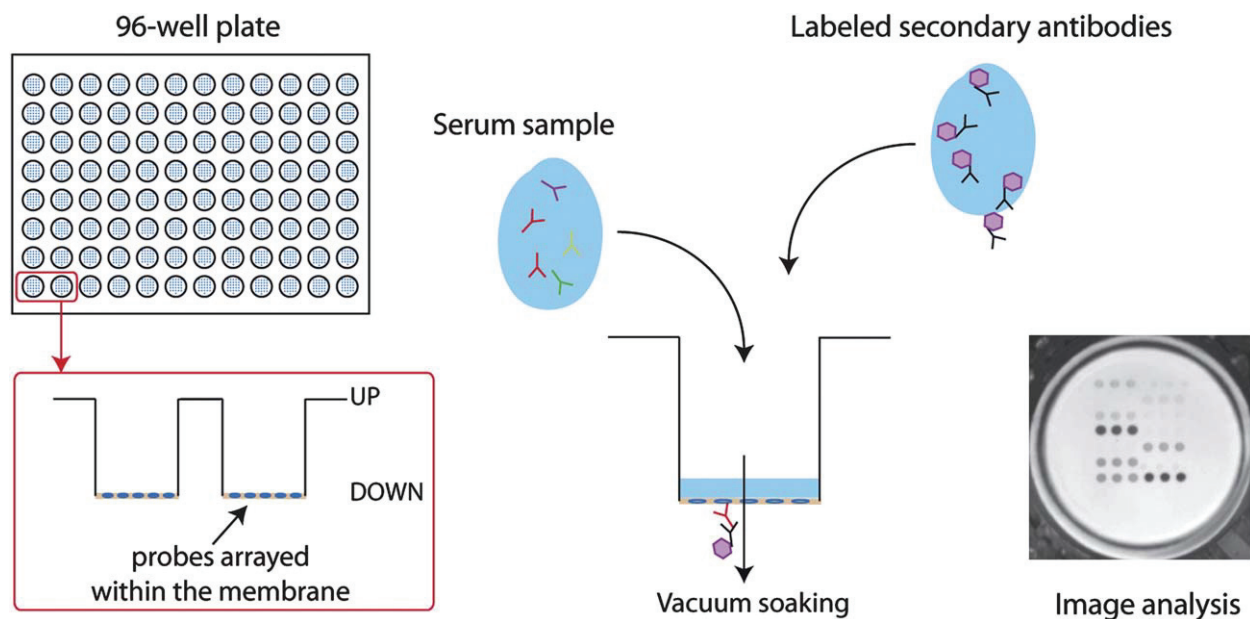


Fig. 1 HiFi-assay design and filtering protocol. The probes are spotted onto the membrane bottom and immobilized within the membrane material (nitrocellulose/cellulose acetate). Inset: a typical flat bed scanner image of the stained positive spots.

performances of microarray technology with a 96-well format standard for robotic, this fully automated diagnostic tool permitted very high-throughput processing of samples in clinical laboratory conditions.

Of course the multiplex membrane such as dot blotting assay or peptide mapping already exists. The innovation is here to produce a diagnosis tool in a complete automated format for the detection of autoantibodies in complex samples. The use of a multiparametric assay presents several advantages for cancer diagnosis, allowing the detection of a panel of auto-antibodies in a single assay format and enabling to reduce not only the assay duration but also the sample and reagent volumes. In the present report, a proof of concept of this approach for the early diagnosis of cancer is presented based on the multiplex detection of auto-antibodies against 12 TAAs (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA). The potential use of the system for cancer detection was demonstrated on a panel of cancer patients. The benefit of combining the detection of five anti-TAA auto-antibodies (p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc) was evidenced by a prediction rate of 72.2%.

Materials and methods

Antigens, antibodies and reagents

Recombinant full length Cyclin B1, Cyclin D1 and p53 were supplied by Santa Cruz Biotechnology (USA). Polyclonal anti-Complement Factor H antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-cyclin B1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-cyclin D1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-c-myc antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-IMP1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-p62 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-survivin antibodies developed in rabbit, monoclonal anti-Her2/neu antibodies (clone 4B8) developed in mouse, monoclonal anti-NY-ESO-1 antibodies (clone E978)

developed in mouse, monoclonal anti-p53 antibodies (clone DO-7) developed in mouse, bovine serum albumin (BSA) and Complement Factor H (CFH) were obtained from Sigma-Aldrich (France). c-myc, IMP1, p62 and survivin were purchased from Proscience (USA). Recombinant Her2/neu was obtained from Alpha Diagnostic International (USA). IMP3 was supplied by Abnova (Taiwan). Recombinant full length NY-ESO-1 was purchased from Spring Bioscience (USA). Prostate Specific Antigen (PSA) was obtained from EXBIO (Czech Republic).

Alkaline phosphatase-labeled anti-human IgG antibodies developed in goat, alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG antibodies developed in goat and alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG antibodies developed in goat were supplied by Jackson Immuno-Research (USA).

Antigen microarrays preparation

Multiscreen-HA 96-well plates bottomed with a nitrocellulose/cellulose acetate membrane were purchased from Millipore (USA). Antigens were spotted in phosphate-buffered saline (PBS, 100 mmol L⁻¹, pH 7.4) with addition of 1 mg mL⁻¹ bromophenol blue as a spotting control. 2.4 nL drops of antigen solution were arrayed (AXO Science, <http://www.axoscience.com>), with a 500 µm spot to spot pitch, on the membrane backside using a noncontact printer (BioChip Arrayer BCA1, Perkin-Elmer, USA). Fifteen different probes were deposited in a 45-spot matrix (Fig. 2) composed of 3 replicates of each TAAs, 3 replicates of positive controls (alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG antibody), 3 replicates of labeling controls (human IgG) and 3 replicates of non-specific interaction controls (bovine serum albumin).

Automated filtration assays

Automated filtration assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, France) specially equipped with a plate filtration unit

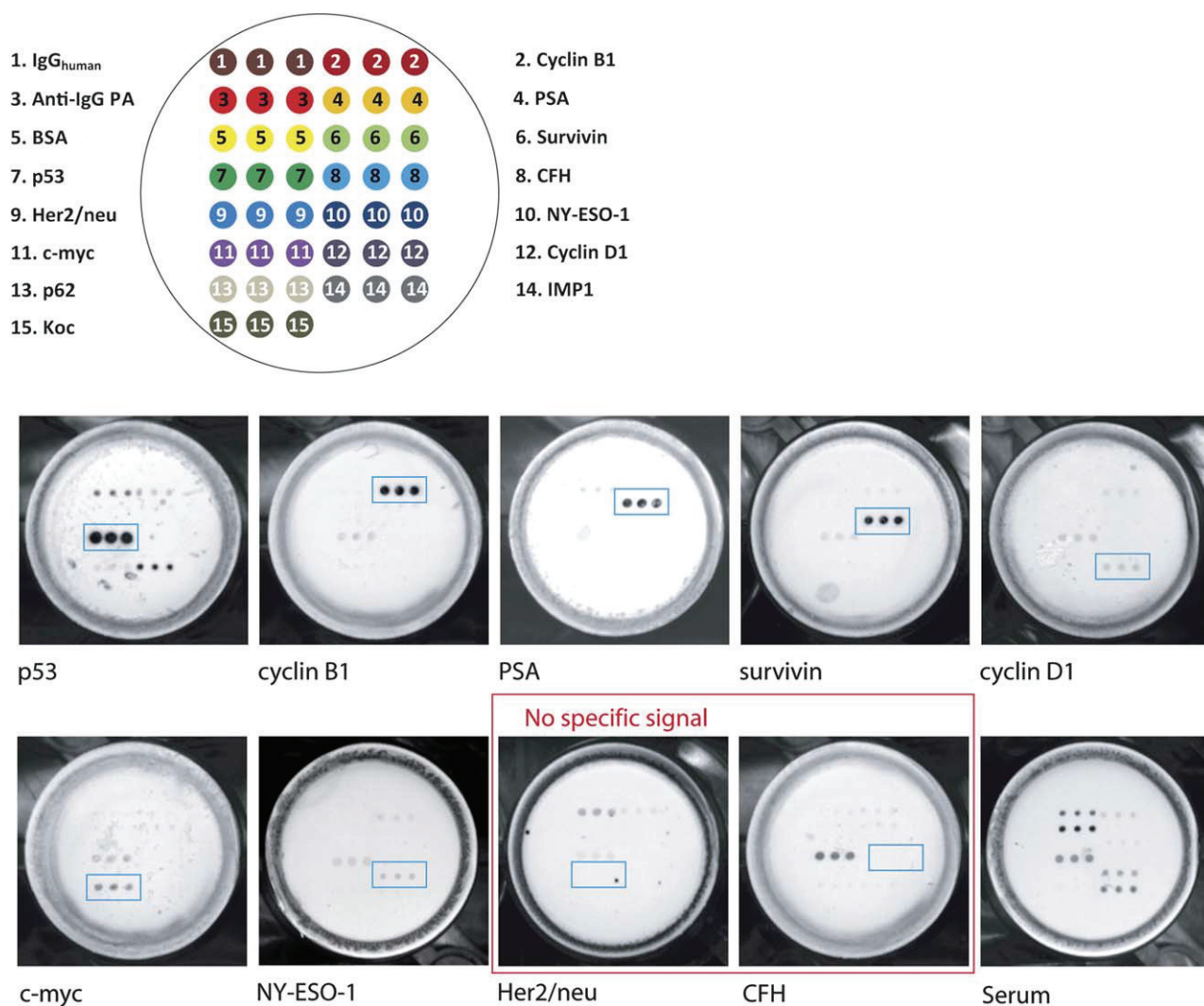


Fig. 2 The HiFi TAA microarray. The TAAs spotting pattern (one 5 mm² array per well, 6 × 8 spots, 12 specific probes and 3 controls) and the flatbed scanner images of 10 membranes incubated with the different purified antibodies or with a cancer patient serum.

and a heater. The vacuum soaking duration was finely controlled in order to generate the most reproducible results. The filtering protocol involved the following steps. Membranes were washed with PBS and saturated with LowCross Buffer (Candor Bioscience, Germany) as a blocking agent to minimize non-specific background signal. Meanwhile, serum samples were pre-incubated in LowCross Buffer on the heater unit at 37 °C for 10 minutes, then transferred to each microwell and incubated on the membrane for interaction during one hour. Alkaline phosphatase labeled anti-human IgG antibodies at a concentration of 0.6 µg mL⁻¹ in LowCross Buffer were subsequently incubated at 37 °C on the membranes for one hour. The membranes were washed with Veronal Buffer Saline (100 mmol L⁻¹, pH 8.5). Finally, 200 µL of a BCIP/NBT ready-to-use solution (Sigma-Aldrich, France) were added in each well for signal generation at room temperature for 20 minutes. The original color of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the product of the enzymatic reaction generates a purple precipitate on positive spots.

The complete protocol duration was 90 minutes, whatever the number of parameter determined.

Data analysis

The microtiter plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in grayscale (from 0 to 65 535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution. Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity of a given TAA was calculated as the mean intensity of all replicates.

Results

The present report describes the proof of concept of a colorimetric multiplex detection of anti-TAA auto-antibodies for the early diagnosis of cancer. In the multiplex immunoassay test proposed here, the membrane bottom of the 96-well microtiter plate plays a double role: on the one hand it enables a filtering

protocol for processing samples and reagents (Fig. 1) and on the other hand it is the immobilization support for protein probes microarrays (one 5 mm² array per well, 6 × 8 spots, 12 specific probes and 3 controls (Fig. 2)). TAA microarrays were designed to detect auto-antibodies directly in patient sera. The different probes were chosen according to their described occurrence in cancer pathologies. Only 12 TAAs were then selected (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA) in order to (i) keep the results analysis simple and efficient, and (ii) make the multiplex immunoassay selective enough to differentiate cancer sera from healthy patients. All these proteins were immobilized within the nitrocellulose/cellulose acetate membrane of a 96-well filtering microtiter plate bottom, using non-covalent interactions. Controlling the availability of these immobilized probes for specific interactions, their spotting reproducibility, the assay conditions and the reactivity of the antigen microarrays toward human auto-antibodies is an absolute requirement.

In order to keep the system as simple as possible, the captured auto-antibodies were detected using the highly effective staining approach based on alkaline phosphatase labeling. Thus, the presence of specific auto-antibodies in samples was visualized through the positive staining of the corresponding TAA spots and was quantified using grayscale analysis (from a flatbed scanner image).

Immobilized probes microarray efficiency

In order to evaluate the reactivity of the immobilized TAA probes, series of experiments were performed using purified commercially available antibodies. In this preliminary study, anti-cyclin B1, anti-cyclin D1, anti-complement factor H, anti-c-myc, anti-p53, anti-survivin, anti-Her2/neu, anti-NY-ESO-1 and anti-PSA purified antibodies were tested on TAA microarrays. From the 9 antibody/TAA interactions tested, Her2/neu and CFH were the only ones which did not generate any specific signal (Fig. 2). This lack of reactivity can be explained either by a miss-orientation of the protein probe inside the membrane (no access to the protein epitope) or a partial or complete unfolding of the TAA once immobilized. As it will be demonstrated later on, these two proteins were able to generate specific signal from serum sample (see Table 1). This lack of reactivity toward the purified antibodies might then be more related to a lack of reactivity of the commercial antibodies themselves.

Typical images obtained by scanning the microarrays after the colorimetric staining of the positive spots are presented in Fig. 2. As a matter of fact, the signal-to-noise ratios of the positive spots are high (from 38.2 for p53 to 4.7 for cyclin D1), thanks to the strong colorimetric signals located at the spot positions, and to the very low background generated from the membrane material. The signal intensity varied between the different probes, as a consequence of the affinity difference between the purified

antibodies. This last point might be of great importance if one planned to compare the different auto-antibody levels of one patient. However, in the present multiplex TAA immunoassay approach, no global normalization is required: each auto-antibody level is used separately for the comparison and ranking of samples. These different TAA probes response toward specific antibodies will then not impact the final application.

In the field of protein microarrays, the quality and robustness of the spotting is a key factor for the achievement of reliable analytical systems. The reproducibility of the signal on each spot family was then first investigated in order to evaluate the spotting quality. A very good mean variability of 2.23% was found between triplicate spots. The microarray to microarray reproducibility was also evaluated on 7 different wells. The calculated mean variation coefficients of positive probe spots were 7.66% and 13.3% for the higher and the weaker signals, respectively.

Once the reactivity of the immobilized probes validated, the capacity to detect anti-TAA auto-antibodies in human sera on the TAA microarrays was evaluated. Fig. 2 presents a typical image of a stained membrane after its incubation with a serum from a prostate cancer patient. As can be seen, specific spots were positively stained within the TAAs panel (p53, NY-ESO-1, cyclin B1 and cyclin D1) while the negative control (BSA) remained unstained and the positive controls (human IgG and alkaline phosphatase labelled antibodies) were stained.

From all these preliminary studies, our TAA microarray system seems to be suitable for the detection of anti-TAA auto-antibodies.

Nevertheless, when it comes to the determination of auto-antibodies in cancer patient sera, the sample dilution must be carefully selected in order to be able to detect any auto-antibody concentration increasing in relation to TAA protein deregulation during tumorigenesis. Therefore, different sample dilutions were tested on the system (1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000 and 1 : 5000), in order to determine the proper serum dilution to be used in assays. From the stained membrane images obtained, specific signals for each dilution were measured and the corresponding numerical data used to build saturation curves (Fig. 3) for each positive protein (here p53, NY-ESO-1, p62 and IMP1). Obviously, in order not to saturate the immobilized probes with the serum antibodies while keeping the strongest signal, the sample required at least a 1 : 500 dilution. In practical, two dilutions were used for the following studies, 1 : 500 and 1 : 2000. The 1 : 500 dilution was used as to produce the highest signal without saturation and the 1 : 2000 dilution used to make sure that, for a particular sample, a clear difference was observed between two different dilutions.

Auto-antibodies detection

HiFi TAA microarrays were used for the characterization of a panel of cancer patients and healthy donors. Serum samples

Table 1 Occurrence of the positive ranking of healthy donor and cancer patient for each TAA

Antigen	Cyclin B1	PSA	Survivin	p53	c-myc	Her2/neu	NY-ESO-1	CFH	Cyclin D1	p62	IMP-1	Koc
Healthy donor occurrence(%)	0	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cancer patient occurrence(%)	22.2	0	5.6	33.3	11.1	5.6	16.7	5.6	0	5.6	27.8	0

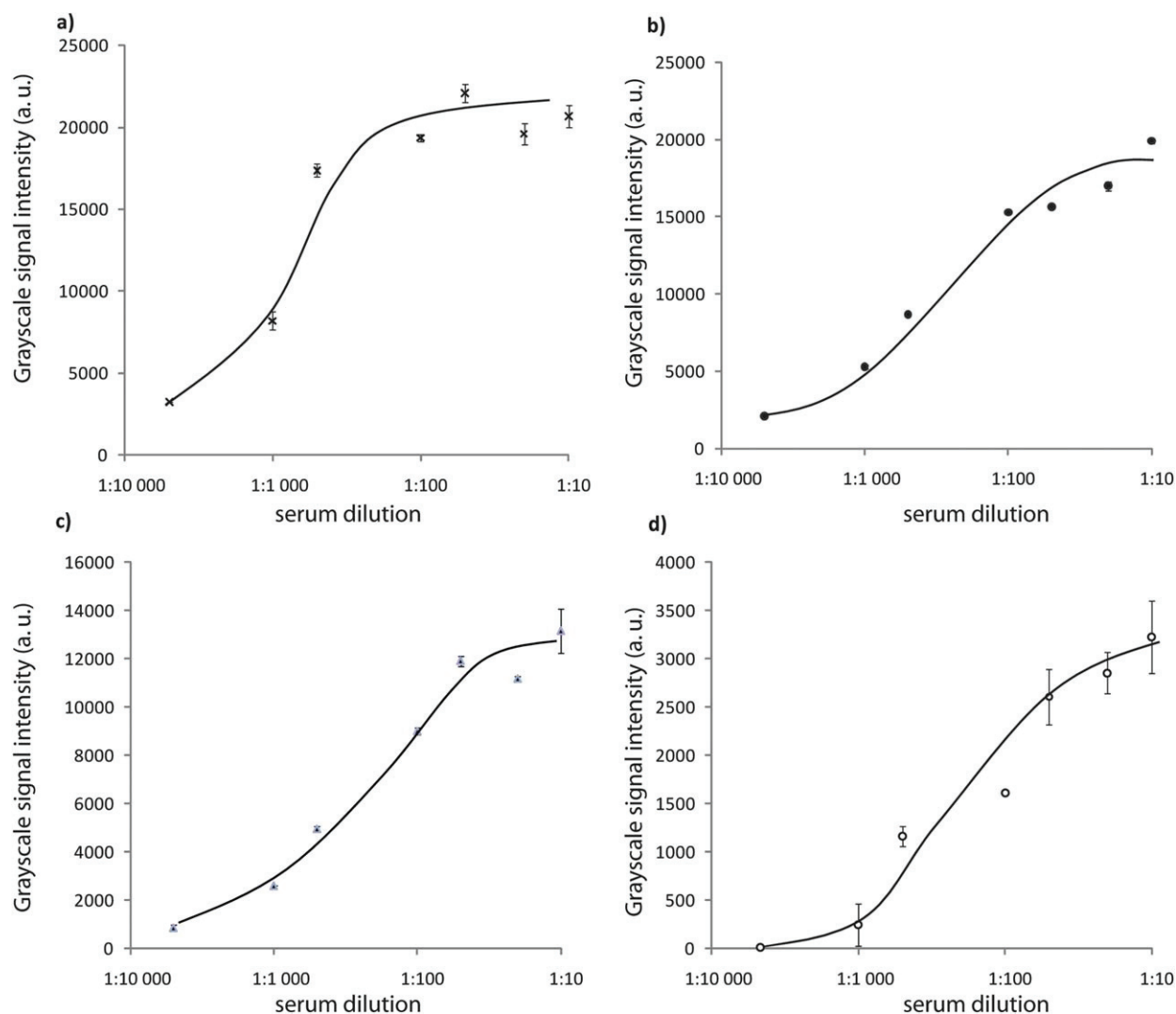


Fig. 3 Sample dilution optimization. (a) Response of the p53 spots, (b) response of the NY-ESO-1 spots, (c) response of the p62 spots and (d) response of the IMP1 spots. All the points are triplicates and performed on a prostate cancer patient.

from 32 clinically confirmed cancer patients (breast and prostate) and 16 healthy donors (93% males, 7% female; between 19 and 36 years old), collected by the Etablissement Français du Sang between 2003 and 2009, were used in this proof of concept study.

In a first set of experiments, healthy donor sera were used to calibrate the system and calculate cut-off values. For each sample, the auto-antibody responses to the immobilized TAA were quantified using the grayscale signal obtained from each spot of the TAA microarray. Then, using the numerical data, cut-off values were calculated, for each TAA, as the mean signal of all normal sera + 3SD.

In a second row of tests, cancer patient sera were analyzed using the TAA microarray. The obtained images were quantified and the resulting values compared to the previously calculated cut-offs. The different samples were then easily classified in two distinct populations, *i.e.* positive or negative toward a specified TAA. An overview of this ranking is given in Table 1.

The first observation is that 3 proteins (PSA, cyclin D1 and Koc) from the 12 TAAs panel did not generate any response from the cancer patient sera. In contrast PSA was generating

false positive from the healthy donors' population. This latter observation is quite surprising since almost 50% of the tested patients were clinically diagnosed for prostate cancer. The anti-PSA auto-antibodies level was then expected to be elevated in their sera. Apparently, the immobilized PSA, which reacts perfectly with purified antibodies (see Fig. 2) was not able to interact with anti-PSA auto-antibodies in sera. Consequently, PSA, cyclin D1 and Koc were removed from the TAA panel for all the subsequent experiments.

Then, from the 9 remaining TAAs, 5 were shown to be able to identify more than 10% of the positive sera from cancer patients. These proteins, *i.e.* p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc, were then chosen as reliable predicting parameters and included in a TAA subpanel. Fig. 4 presents the responses of the healthy donor and cancer patient sera to this panel of 5 proteins, together with the above mentioned cut-off values and a summary of the auto-antibodies occurrence toward the subpanel in patient sera (Fig. 4, table).

These last results clearly demonstrate, just like the Shi *et al.* work before using conventional ELISA,²⁰ that the use of TAAs

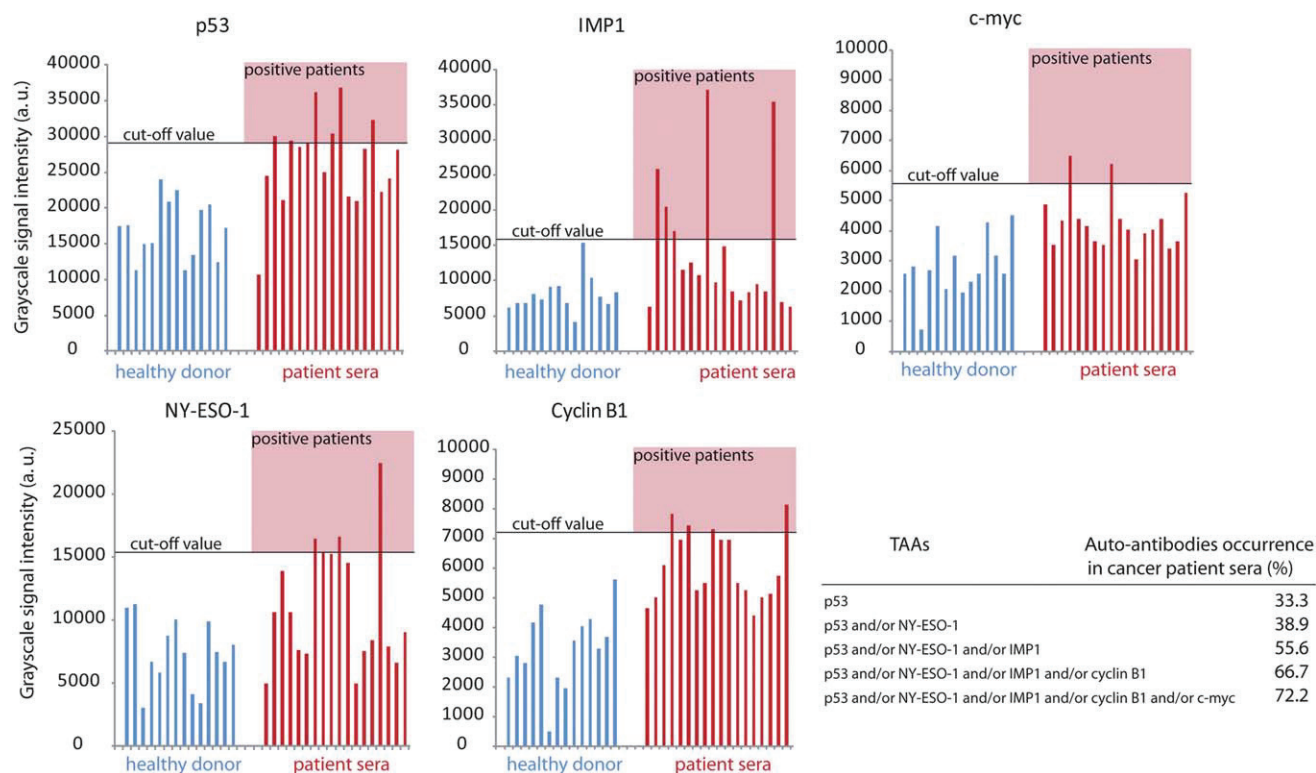


Fig. 4 Multiplex detection of anti-TAA auto-antibodies. Healthy donor and cancer patient serological responses toward the selected 5 TAA's subpanel (sample dilution 1 : 500). Cut-off values were calculated, for each TAA, as the mean signal of all healthy donor sera + 3SD. Inset: added occurrence of the auto-antibodies in cancer patient sera.

panel, instead of an isolated single parameter, results in an increase in the prediction efficiency of positive patients. Indeed, the addition of the positive samples toward NY-ESO-1 and p53 increased the predicting percentage of positive patients from 33.3 to 38.9%. Then, adding again the IMP-1, the cyclin B1 and the c-myc responding samples enabled the increase in this predicting value to 55.6%, 66.7%, and to 72.2%, respectively. Finally, using only a 5 TAA's subpanel, 72.2% of cancer patients were ranked positive, using a single experiment.

Conclusions

Elaboration of innovative and noninvasive tools to help oncologists in the diagnosis and treatment of cancer is nowadays a great challenge. An effective and reliable device would allow helping them in numerous tasks, such as early and differential diagnosis of tumors, choice of treatment strategy, prognosis, follow-up of tumor progression, and estimation of therapeutic efficiency. In this context, high-throughput and multiplex detection of various auto-antibodies in blood samples would be a major advance.

In this study, we evaluated the performance, characteristics and applicability of a new fully automated multiplex immunoassay that enables the simultaneous detection of auto-antibodies against different TAA's, specifically present in cancer patient sera. Several probes must be used in order to differentiate cancer patients from healthy donors. Indeed, all of the cancer patients exhibit specific auto-immunity against the different antigens and for example some of the cancer patients tested in the present

study (27.8%) had no detectable auto-antibodies against any of the selected probe.

Besides, some of these selected probes were shown to be not reliable, because of their lack of specificity/reactivity toward the present cancer patient auto-antibodies. In fact, 2 probes of the panel (Koc and cyclin D1) did not give any positive signal for cancer patients. Another probe, PSA, not only did not permit to define any positive sample from patients, but also generated a false-positive result from a healthy donor serum. These data demonstrated the advantageous use of a multiple antigen panel in increasing the sensitivity of auto-antibody detection in cancer sera. In order to improve the diagnosis efficiency of the immunoassay, it would be necessary to implement the TAA panel with complementary antigens. Moreover, testing a larger population of healthy sera would enable the calculation of more accurate cut-off values for each probe, and would therefore permit to avoid false-positive results.

As a final remark, it has to be mentioned that in the present study no differentiation was made between the patients affected by breast or prostate cancer on the basis of the TAA's microarray response. In other words, no cancer specific profile was identified using the actual TAA's panel. However, by tuning the antigen panel using proteins more specific of a type of cancer, it would be conceivable to differentiate cancers. Numerous biomarkers specific of a particular cancer type were already described.²² By testing these markers on normal and patients sera of identified cancer types, it would be possible to determine if these new combinations of markers can be accurate diagnosis tools.

Notes and references

- 1 *World Cancer Report*, ed. P. Boyle and B. Levin, World Health Organisation and International Agency for Research on Cancer, 2008.
- 2 J. D. Wulfsberg, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 267–275.
- 3 C. A. Casiano, M. Mediavilla-Varela and E. M. Tan, *Mol. Cell. Proteomics*, 2006, **5**, 1745–1759.
- 4 J. Qiu, J. Madoz-Gurpide, D. E. Misek, R. Kuick, D. E. Brenner, G. Michailidis, B. B. Haab, G. S. Omenn and S. Hanash, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 261.
- 5 T. Soussi, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1777–1788.
- 6 M. L. Disis, E. Calenoff, G. McLaughlin, A. E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R. B. Livingston, R. Moe and M. A. Cheever, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 16–20.
- 7 G. Covini, E. K. L. Chan, M. Nishioka, S. A. Morshed, S. I. Reed and E. M. Tan, *Hepatology*, 1997, **25**, 75–80.
- 8 M. L. Lu, R. M. Nakamura, E. D. Dent, J. Y. Zhang, F. C. Nielsen, J. Christiansen, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Am. J. Pathol.*, 2001, **159**, 945–953.
- 9 J. Y. Zhang, E. K. L. Chan, X. X. Peng, M. L. Lu, X. Wang, F. Mueller and E. M. Tan, *Clin. Immunol.*, 2001, **100**, 149–156.
- 10 G. Ambrosini, C. Adida and D. C. Altieri, *Nat. Med.*, 1997, **3**, 917–921.
- 11 J. Rohayem, P. Diestelkoetter, B. Weigle, A. Oehmichen, M. Schmitz, J. Mehlhorn, K. Conrad and E. P. Rieber, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1815–1817.
- 12 K. Benmahrez, D. Thierry, I. Sorokine, A. Dannamuller and M. Kohiyama, *Br. J. Cancer*, 1988, **57**, 529–534.
- 13 K. B. Marcu, S. A. Bossone and A. J. Patel, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, **61**, 809–860.
- 14 G. Turashvili, S. E. McKinney, O. Goktepe, S. C. Leung, D. G. Huntsman, K. A. Gelmon, G. Los, P. A. Rejto and S. A. J. R. Aparicio, *Mod. Pathol.*, Advance Online.
- 15 T. H. Patwa, C. Li, L. M. Poisson, H.-Y. Kim, M. Pal, D. Ghosh, D. M. Simeone and D. M. Lubman, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2215.
- 16 D. G. McNeel, L. D. Nguyen, B. E. Storer, R. Vessella, P. H. Lange and M. L. Disis, *J. Urol.*, 2000, **164**, 1825–1829.
- 17 M. K. Brawer, M. P. Chetner, J. Beatie, D. M. Buchner, R. L. Vessella and P. H. Lange, *J. Urol.*, 1992, **147**, 841–845.
- 18 E. Jager, S. Gnjjatic, Y. Nagata, E. Stockert, D. Jager, J. Karbach, A. Neumann, J. Rieckenberg, Y. T. Chen, G. Ritter, E. Hoffman, M. Arand, L. J. Old and A. Knuth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 12198–12203.
- 19 J. Y. Zhang, C. A. Casiano, X. X. Peng, J. A. Kozio, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, 2003, **12**, 136–143.
- 20 F.-D. Shi, J.-Y. Zhang, D. Liu, A. Rearden, M. Elliot, D. Nachtsheim, T. Daniels, C. A. Casiano, M. J. Heeb, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Prostate*, 2005, **63**, 252.
- 21 G. C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 6185–6192.
- 22 F. M. Brichory, D. E. Misek, A. M. Yim, M. C. Krause, T. J. Giordano, D. G. Beer and S. M. Hanash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 9824–9829.

Chapitre 6. Développement d'outils de détection destinés au contrôle environnemental

1. INTRODUCTION

Dans le cadre du projet européen BONAS (*BOmb factory detection by Network of Advanced Sensors* – Détection de fabrique de bombe à l'aide d'un réseau de capteurs), nous avons travaillé en collaboration avec plusieurs autres équipes, dans le but de développer un réseau de plusieurs capteurs. Notre objectif au laboratoire a été le développement d'un capteur pour la détection d'explosifs dans l'eau. Deux capteurs différents ont finalement été développés dans ce but.

Le premier, dans la continuité des travaux précédents, consiste en un outil d'analyse par immunotest permettant la détection multiparamétrique de différents polluants dans l'eau, pour une application plus générale au contrôle environnemental : deux explosifs, le 2,4,6-trinitrotoluène (TNT) et le 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine (RDX) mais aussi deux pesticides, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et le 2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (atrazine) et une toxine, l'acide okadaïque ont été définis comme cibles, et utilisés comme sondes avec un contrôle négatif, l'acide 4-benzoylbenzoïque (4-BBA). La première partie de ce chapitre concerne la conception et le développement de cet immunoessai multiparamétrique. Bien que l'application soit très différente de celle décrite dans le chapitre précédent, le test d'analyse développé doit répondre à des besoins spécifiques proches. En effet, un outil destiné au contrôle environnemental doit également permettre d'obtenir le plus d'informations possibles en un temps réduit. De plus, le nombre d'échantillons à tester pour une telle application représente une demande très importante, associée à la nécessité de développer de nouveaux supports d'analyse multiplexée à haut-débit. De ce fait, ici encore, l'analyse multiparamétrique et l'automatisation sont des critères clés.

Le second capteur concernera la détection de précurseurs d'explosifs dans l'eau. Cet outil sera plus particulièrement dédié au contrôle dans l'environnement lié à la sécurité, permettant la localisation d'une activité anormale de synthèse d'explosifs. Dans ce cadre, plusieurs molécules différentes devront être détectées en même temps, impliquant à nouveau la nécessité d'une analyse multiparamétrique. Le nouveau critère impliqué concerne le mode et le lieu d'analyse. Contrairement aux outils développés précédemment, l'analyse devra être effectuée directement sur site, sans prélèvement préalable, et devra permettre d'obtenir un résultat instantané. Pour cela, une méthode de mesure électrochimique sera utilisée.

2. APPLICATION 1 : LE CONTROLE DE LA QUALITE DE L'EAU

2.1. CONCEPTION DE L'OUTIL D'ANALYSE MULTIPARAMETRIQUE A HAUT DEBIT

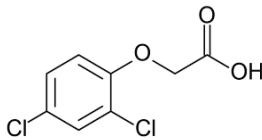
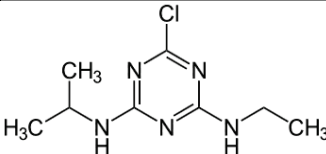
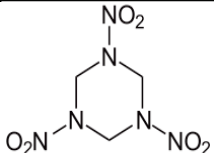
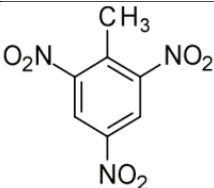
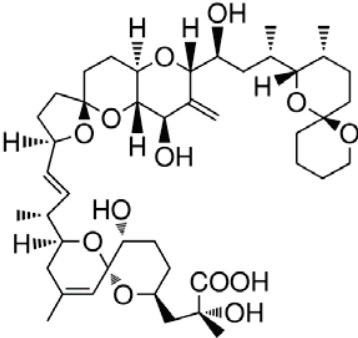
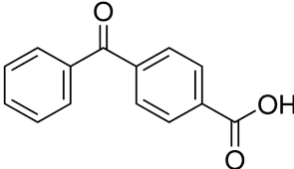
Contrairement au diagnostic dans un échantillon de sang, dans lequel les anticorps sont les témoins d'une pathologie, on va ici chercher à détecter de petites molécules. Le système d'immunodétection ne pourra donc pas être construit de la même façon, on utilisera ici les anticorps pour détecter les petites molécules plutôt que les sondes pour détecter les anticorps.

Dans le cas de la détection de petites molécules dans l'eau, pour se servir de la reconnaissance par des anticorps il est nécessaire d'utiliser une méthode indirecte. Les sondes immobilisées sur le support choisi correspondent aux molécules à détecter, elles sont reconnues par des anticorps spécifiques qui sont ensuite reconnu par un anticorps secondaire marqué, de façon à générer un signal. Dans ce cas précis, la présence des molécules cibles dans l'échantillon va générer une perte de signal : les anticorps, au lieu d'interagir avec les sondes sur le support, vont interagir avec les molécules cibles présentes dans l'échantillon. La Figure 4-17, présentée à la page 151 illustre le mécanisme d'action pour ce type d'immunoessai compétitif, en comparaison avec un immunoessai direct.

Les polluants étant de petites molécules, d'une masse comprise entre 216 g/mol pour l'atrazine et 805 g/mol pour l'acide okadaïque, leur immobilisation sur le support ne peut être réalisée qu'à l'aide d'un greffage sur des molécules de taille plus importantes. Ces petites molécules ayant pour la plupart une fonction acide carboxylique, le greffage est effectué via les fonctions amines primaires des molécules servant de porteur. Différentes molécules-porteurs ont été envisagées. Classiquement, des protéines telles que l'albumine de sérum bovin peuvent être utilisées. Cette protéine contient 607 résidus, dont 59 résidus lysine, dont une trentaine potentiellement utilisables pour le greffage sachant que seuls ceux situés à l'extérieur de la protéine native pourront être atteints (Muller *et al.* 1999). Deux polymères ont également été envisagés : un polymère de dextran de 500 kDa, modifié par des groupements NH_2 à raison de 146 NH_2 par molécule, et des billes de latex. Ces billes, d'une taille de 1 μm de diamètre, sont également modifiées par des groupements NH_2 pour un greffage direct des petites molécules. Les polluants utilisés sont présentés dans le Tableau 6-1. Le protocole de greffage est décrit dans le détail à la page 136, dans la partie 2.1.2 du chapitre Matériel et Méthodes.

Le TNT ne comprenant pas de fonction acide carboxylique, un dérivé présentant un groupement acide sulfonique a été utilisé, l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (Shriverlake *et al.* 1995) . Le greffage a été alors effectué de la même façon qu'avec les autres molécules. Le même problème s'est posé pour le RDX. Un conjugué RDX-Ovalbumine et deux conjugués RDX-Dextran (formés à l'aide de deux types de réactions) ont alors été fournis par le Professeur Girotti en collaboration avec le Docteur Montoya. L'atrazine ne présentant pas non plus de fonction acide carboxylique, un conjugué Atrazine-BSA commercial a été directement utilisé.

Tableau 6-1. Liste des polluants sélectionnés

Type de polluant	Molécule	Structure 2D	Masse molaire
Pesticides	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)		221 g/mol
	2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (Atrazine, Atz)		216 g/mol
Explosifs	1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine (RDX)		222 g/mol
	2,4,6-trinitrotoluène (TNT)		227 g/mol
Toxine	Acide okadaïque (OA)		805 g/mol
Contrôle	Acide 4-benzoylbenzoïque (4-BBA, contrôle négatif)		226 g/mol

Des études ont été effectuées au laboratoire sur un nouveau support, un adhésif sensible à la pression pouvant à la fois jouer le rôle de support pour l'immobilisation de sondes, et être intégré à différents systèmes (plaque 96 puits sans fond, mais aussi réseau microfluidique (Corgier *et al.* 2011)). Les performances associées à différentes surfaces d'immobilisation en fond de plaque 96 puits ont été évaluées et comparées, en premier lieu pour leur application à des puce à oligonucléotides : la surface de polystyrène constituant les plaques 96 puits classiques, les membranes utilisées en fond de puits comme dans la partie précédente, et le support adhésif (Figure 6-1) (Le Goff *et al.* 2012). Ces études ont démontré le potentiel de ce nouveau support pour des tests à détection colorimétrique tels que ceux développés dans le cadre de cette thèse. En effet, le précipité produit suite à la réaction catalysée par la

phosphatase alcaline est très bien retenu, grâce aux propriétés poreuses de la couche adhésive. Par ailleurs, les plots obtenus par dépôt piézoélectrique sur cette surface sont caractérisés par un diamètre inférieur à celui généré par le dépôt sur les membranes, permettant ainsi d'améliorer la résolution des plots et d'envisager l'utilisation de matrices de plus haute densité (nombre de plots plus important). En outre, une meilleure reproductibilité des lots a été observée, en comparaison à celle des plaques 96 puits à fond membranaires, inférant une plus grande robustesse au système.

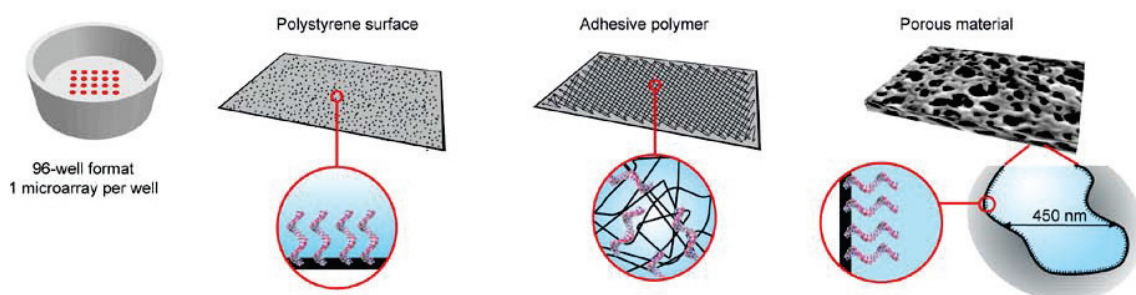


Figure 6-1. Représentation schématique des supports envisagés pour l'immobilisation de matrices de plots en fond de puits
(Extrait de Le Goff *et al.* 2012)

D'un point de vue pratique, dans la préparation de l'outil d'analyse, l'adhésif présente d'importants avantages, notamment au niveau de la simplicité d'utilisation et de mise en œuvre. Les plaques 96 puits pré-montés de membranes présentent plus de fragilité, et de risques de contamination de l'extérieur des membranes ou de l'intérieur des puits. En outre, le support adhésif, étant totalement plan, permet un dépôt des sondes facilité. Enfin, l'assemblage de ce support d'immobilisation avec la plaque 96 puits est aisément réalisé, du fait de ces propriétés adhésives.

2.2. OPTIMISATION DES PARAMETRES PRINCIPAUX

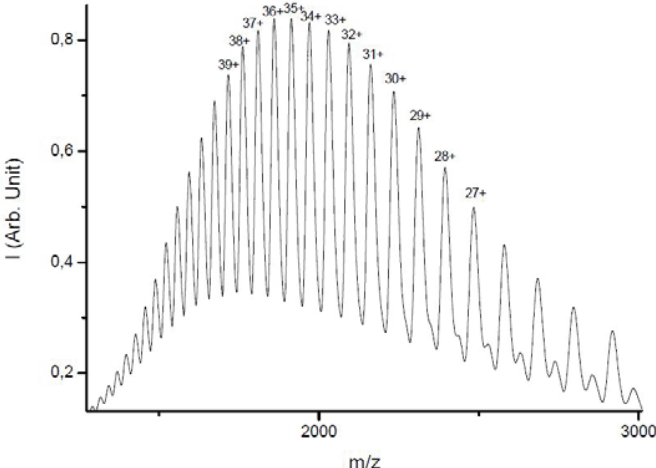
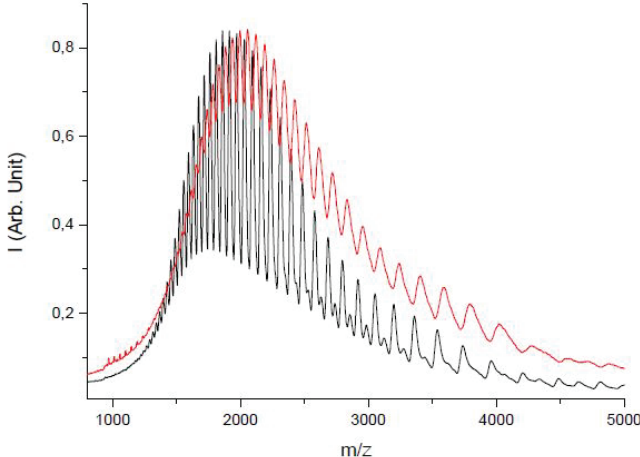
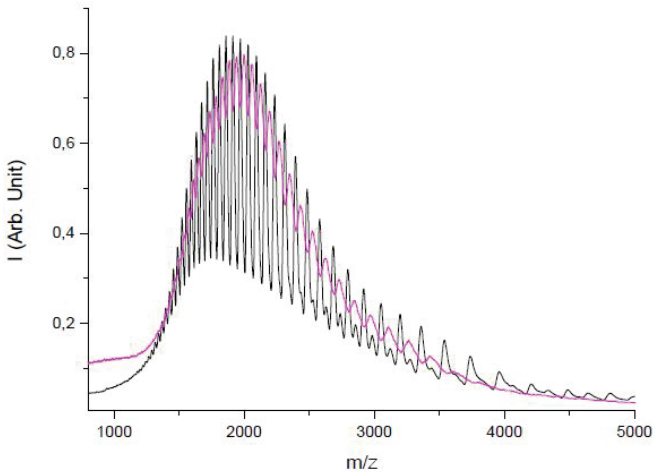
2.2.1. PREPARATION DES CONJUGUES

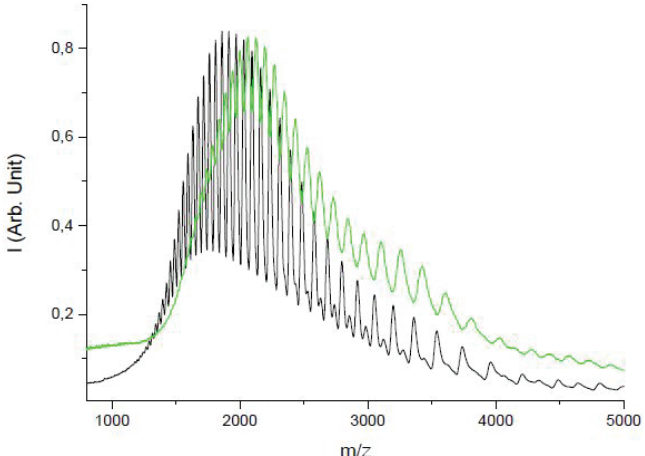
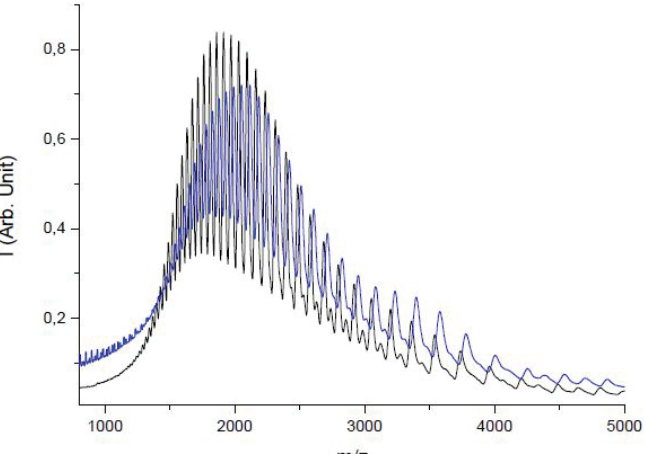
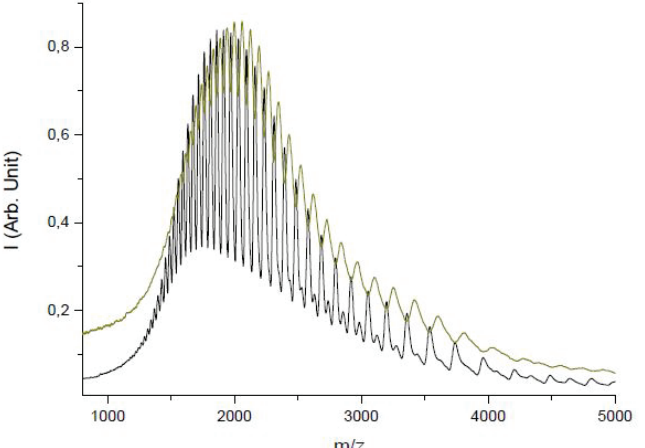
Des gammes de concentration des petites molécules à greffer ont été réalisées de façon à optimiser les possibilités d'interactions avec les anticorps. Le couplage a été effectué avec des concentrations de 30 – 3 – 0,3 – 0,03 – 0,003 – 0 mmol/L. La concentration de greffage la plus importante a conduit à la formation d'agrégats, et n'a ainsi pas pu être utilisée. Les immunoessais ont été réalisés sur ces sondes avec l'incubation de gammes de concentration des différents anticorps correspondants. La concentration de greffage de 3 mmol/L a alors été choisie, donnant le signal le plus important pour toutes les concentrations d'anticorps.

Les conjugués BSA-petites molécules synthétisés dans les conditions optimales ont été analysés par spectrométrie de masse afin de quantifier le nombre de petites molécules fixées par molécule de BSA. Les spectres de masse ont permis d'obtenir les résultats présentés dans le Tableau 6-2. L'analyse des conjugués dextran et latex n'a pas fonctionné, du fait de leur taille trop importante. Cependant, les immunoessais ont validé la réactivité de ces conjugués.

Tableau 6-2. Détermination du nombre de molécules greffées par molécule de BSA

Pour chaque spectre de masse, le spectre en noir correspond à la BSA, et celui en couleur au conjugué BSA-petite molécule.

Molécule Ou conjugué	Spectre de masse	Molécules greffées
BSA		Non Applicable
BSA-2,4-D		4
BSA-2,4,5-T		4

BSA-4-BBA		5
BSA-TNT		3
BSA-OA		1

Le nombre de molécules greffées par molécule de BSA a été déterminé à partir du spectre de masse de la BSA comparé à celui des conjugués. Pour cela, la masse de la BSA a été d'abord calculée pour les états de charge 27+ à 39+. Elle est de 66 962 Da. La masse des conjugués a ensuite été calculée pour les mêmes états de charge, puis soustraite à la masse de la BSA. La masse restante, représentant la masse totale des molécules organiques greffées, a été divisée pour chacun des conjugués par la masse connue

de la molécule organique utilisée pour le greffage. Ce rapport permet alors d'obtenir le nombre de molécules fixées par molécule de BSA. Les résultats attestent de la réussite du greffage, avec 1 molécule greffée au minimum (pour l'acide okadaïque, qui est le plus gros composé utilisé), et jusqu'à 5 molécules greffées par molécule de BSA (pour 4-BBA).

Sachant qu'environ 30 résidus lysine sont accessibles sur la protéine, le rendement de greffage est en moyenne de 13,3 % pour les composés de masse molaire proche de 220 g/mol, et de 3,3 % pour le composé de masse molaire la plus importante (805 g/mol). L'amélioration du rendement de greffage aurait pu être envisagée si des concentrations plus importantes de molécules organiques activées n'avaient pas conduit à la formation d'agrégats. Cependant, les conjugués ainsi formés ont permis d'obtenir un signal spécifique important sur les plots après incubation des anticorps. Ce nombre de molécules fixées est donc suffisant pour la réussite de l'immunoessai.

2.3. DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE POUR LE CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

Les résultats obtenus lors de cette étude sont décrits dans l'article suivant.

❖ Article 3. HIGH-THROUGHPUT MULTIPLEXED COMPETITIVE IMMUNOASSAY FOR POLLUTANTS SENSING IN WATER

Cloé Desmet, Loïc J. Blum, et Christophe A. Marquette

Analytical Chemistry, 2012, 84, 10267 – 10276

Cet article décrit le développement d'un nouveau système d'analyse multiparamétrique dédié au contrôle de la qualité de l'eau. Le processus de fabrication et d'utilisation de cet outil comprend différentes parties. La première a consisté en la synthèse de conjugués de polluants sur des molécules-porteurs, de façon à pouvoir intégrer ces haptènes à une matrice de plots. La puce à petites molécules a ensuite été formée par dépôt non contact des conjugués sondes sur un support adhésif, ensuite assemblé à une plaque 96-puits sans fond, afin d'obtenir une matrice de sondes dans le fond de chacun des puits. Après optimisation des conditions et criblage des conjugués selon leur réactivité et réactivité croisée avec les anticorps, le conjugué permettant d'obtenir le signal spécifique le plus important a été sélectionné pour chaque polluant. La concentration d'anticorps a également été choisie de façon à limiter les réactions croisées tout en maintenant un signal spécifique élevé. L'immunoessai a alors été calibré pour chacun des polluants cibles, en mode compétitif. Cette étape est réalisée en format mono-paramétrique, un polluant est testé par puits, en présence d'une gamme de concentrations pour chacun des polluants. Cette calibration permet non seulement la détermination des limites de détection pour chaque cible, mais servira aussi à calculer la concentration en polluant dans des échantillons de composition inconnue, à partir du signal colorimétrique obtenu. Enfin, la validation du système a été réalisée. Des échantillons contenant des concentrations différentes d'un ou plusieurs polluants ont été testés en présence du mélange des anticorps spécifiques. Les concentrations ont alors été calculées à

partir des signaux colorimétriques, et à l'aide des courbes de calibrations. Le pourcentage de détermination a alors été calculé.

Le système développé ici permet la détection des 5 polluants cibles avec des limites de détections évaluées à 0,02 µg/L pour l'acide okadaïque, 0,01 µg/L pour l'atrazine, 0,01 µg/L pour le 2,4-D, 100 µg/L pour le TNT, et 0,02 µg/L pour le RDX. Le test de ce système avec des échantillons de composition différentes, a permis de déterminer les concentrations des polluants cibles avec 82,5 % de succès, 13,75 % d'approximations, et 3,75 % de faux-positifs. Malgré l'optimisation des conditions, la réactivité croisée restante induit donc des risques de faux-positifs, notamment sur les plots correspondant à la détection de l'atrazine. Ceci peut être expliqué notamment par la réactivité-croisée non-négligeable observée entre les anticorps anti-atrazine et les analytes en solution. Certaines études ont démontré que cette réactivité croisée pouvait être utilisée pour améliorer la détection, en définissant des signatures de la réponse de chacune des cibles au niveau de chaque plot de sonde et en les analysant par des méthodes chimiométriques (Bhand *et al.* 2005). Ce type d'approche pourrait être utilisée avec le système développé ici, afin d'améliorer ses performances.

High-Throughput Multiplexed Competitive Immunoassay for Pollutants Sensing in Water

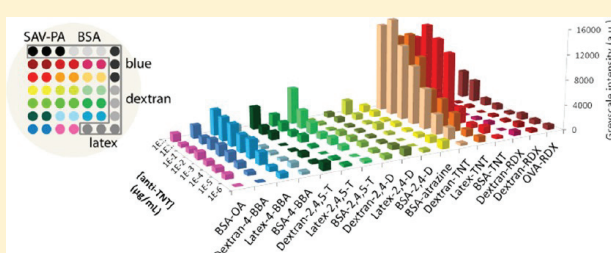
Cloé Desmet,[†] Loïc J. Blum,[†] and Christophe A. Marquette^{*,†,‡}

[†]Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1-CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE-43, bd du 11 Novembre 1918-69622 Villeurbanne, Cedex, France

[‡]AXO Science SAS, 34 Rue du Mail, 69004 Lyon, France

S Supporting Information

ABSTRACT: The present study described the development and evaluation of a new fully automated multiplex competitive immunoassay enabling the simultaneous detection of five water pollutants (okadaic acid (OA), 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (atrazine), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), and 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine (RDX)). The technology is taking advantage of an optical-clear pressure-sensitive adhesive on which biomolecules can be immobilized and that can be integrated within a classical 96-well format. The optimization of the microarray composition and cross-reaction was performed using an original approach where probe molecules (haptens) were conjugated to different carriers such as protein (bovine serum albumin or ovalbumin), amino-functionalized latex beads, or dextran polymer and arrayed at the surface of the adhesive. A total of 17 different probes were then arrayed together with controls on the adhesive surface and screened toward their specific reactivity and cross-reactivity. Once optimized, the complete setup was used for the detection of the five target molecules (less than 3 h for 96 samples). Limits of detection of 0.02, 0.01, 0.01, 100, and 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ were found for OA, atrazine, 2,4-D, TNT, and RDX, respectively. The proof of concept of the multiplex competitive detection (semiquantitative or qualitative) of the five pollutants was also demonstrated on 16 spiked samples.



The presence of toxic contamination traces in water having adverse effect on human health and wildlife is an ongoing concern. These pollutants can be pesticides/herbicides coming from intensive agricultural activities, industrial side products, pharmaceutical chemistry inherited compounds (drugs, antibiotic), explosives molecules from terrorists and military activities, or toxins produced by marine animals or phytoplankton blooms. Okadaic acid (OA), for example, is a diarrhetic toxin produced by toxicogenic dinoflagellates. This phycotoxin accumulates in the digestive glands of shellfish without a toxic effect to its host. Nevertheless, as shellfish is a part of human alimentation chain, this toxin accumulation can be harmful, causing diarrhetic shellfish poisoning (DSP), which is characterized by gastrointestinal disorders.¹

Explosive molecules, such as 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) or 1,3,5-trinitroperhydro-1,3,5-triazine (RDX), are also considered as toxic compounds since they may cause severe health problems in both animals and humans populations.^{2,3} These troubles include anemia, abnormal liver function, cataract development, and skin irritation. Besides, the Environmental Protection Agency (EPA) has determined that TNT and RDX are possible human carcinogens. TNT and RDX pollute the environment through the contamination of waste waters and solid wastes coming from either the explosive industry and the related bombing activity or the bomb recycling. Thus, different military

and terrorist activities worldwide have resulted in extensive contamination of soil and groundwater by TNT or RDX.⁴

Atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are organochlorine herbicides used in global intensive agriculture. Because of their widespread use and persistence, their accumulation in soil and groundwater became a real public health issue. In the European Union, concentration limits for individual pesticides and the total pesticide content in drinking water are 0.1 and 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.⁵ In the U.S., the EPA sets the maximum allowed concentrations for common pesticides such as atrazine to 3 $\mu\text{g L}^{-1}$.⁶

The detection of these different types of molecules is an important environmental, security, and health concern for the global community. The simultaneous presence of more than one of these pollutants in water is now often performed, and multiparametric analytical tools are required. Currently, detection of herbicides is mostly performed by chromatography (gas chromatography (GC), high-pressure liquid chromatography (HPLC)), mass spectrometry (mass spectrometry-time-of-flight (MS-TOF), mass spectrometry-ion trap (MS-IT), mass spectrometry-quadrupole (MS-Q)), and capillary electropho-

Received: July 26, 2012

Accepted: October 30, 2012

Published: October 30, 2012

resis (CE) methods. For instance, the EPA recommends GC/MS and GC/electron capture detection (ECD) for analysis of atrazine and 2,4-D in water samples.^{7–9} Nevertheless, these methods are still time-consuming and rely on sophisticated equipments and laborious sample preparation. In order to cope with these issues, there is a growing demand from the environmental monitoring community for inexpensive and sensitive analytical devices that are reliable, rapid, and capable of high-throughput testing. Among the different types of sensors recently developed for this purpose (electrochemical sensors, mass sensors, and optical sensors^{10–13}), immunoassay like systems appear to be the most popular thanks to their high selectivity and to the standardization and automation possibilities of their protocols. Particularly, monoparametric immuno-sensors have been proven to be valuable tools to detect trace amounts (ppm to ppb) of specific contaminants such as pesticides, toxins, or explosives in environmental samples.^{14,15} However, most of the previous systems dedicated to the detection of environmental pollutants were focused on few toxicants only and rarely integrating different pollution sources (i.e., intensive agricultural activities, industrial side products, pharmaceutical chemistry, military activities, and phytoplanktons).^{16–19} For example, Morais et al. recently described an on-disk multiplexed immunoassay for the detection of pesticides and antibiotics.²⁰ In a similar way Weller et al. described a “parallel affinity sensor array” dedicated to the direct and indirect immunodetection of contaminants in water thanks to a glass slide biochip.²¹

In the present communication, we report a new multiplex immunoassay for the simultaneous detection of environmental pollutants coming from intensive agricultural activities, military activities and phytoplankton blooms (atrazine, 2,4-D, RDX, TNT, and okadaic acid (OA)). For the development of this multiplex immunoassay, we have been screening 17 carrier-hapten conjugates toward their reactivity and cross-reactivity with specific antibodies. Using microarrays in a 96-well plate format enabled us to generate large amount of experimental data in highly controlled conditions, facilitating the optimization of the first five-plex competitive immunoassay. The operational multiparameter tool was demonstrated to be able to simultaneously detect atrazine, 2,4-D, RDX, TNT, and OA with limits of detection relevant to the EU and U.S. regulations.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Pollutants, Antibodies, and Reagents. Polybead Amino Microspheres (1.00 μm) were purchased from Polyscience, U.S. Dextran Amino (500 000 Da) was supplied by Life Technologies, United Kingdom. BCIP/NBT, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (atrazine), 2,4-D, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 4-benzoylbenzoic acid (4-BBA), okadaic acid from *Prorocentrum concavum*, picrylsulfonic acid (TNBS) solution 1 M in H_2O , bovine serum albumin (BSA), and alkaline phosphatase labeled antimouse IgG (Fc specific) antibodies developed in goat were obtained from Sigma-Aldrich, France. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and RDX were purchased from LGC Standards, France. Atrazine-BSA and antiatrazine 6F36 monoclonal antibodies developed in mouse were supplied by Euromedex, France. Anti-RDX antibodies and anti-TNT A1 monoclonal antibodies developed in mouse were supplied by Strategic Diagnostics, U.S. Antiokadaic acid 7E1 monoclonal antibodies developed in mouse were purchased from Santa Cruz Biotechnology, U.S. Alkaline phosphatase-labeled antimouse IgG antibodies (H+L) developed in goat were supplied by

Jackson Immuno-Research, U.S. LowCross-Buffer was purchased from Candor Bioscience, Germany. Anti-2,4-D E2G2 monoclonal antibodies were kindly provided by Dr. Milan Franek. RDX-ovalbumin (OVA-RDX) and dextran-RDX were kindly provided by Prof. Stephano Girotti.

Hapten-Carrier Conjugates Synthesis. In order to integrate in a microarray the small molecule hapten probes (about 300 g mol^{-1} for explosives and pesticides and 800 g mol^{-1} for toxins), conjugates of higher molecular weight were synthesized. Seven different haptens (three pesticides, atrazine, 2,4-D, and 2,4,5-T; two explosives, TNT and RDX; one toxin, okadaic acid; one control, 4-BBA) were conjugated to three different carriers (latex-amino, dextran-amino, and BSA). For the okadaic acid conjugate, BSA only was used on the basis of the good results obtained previously with this probe.²²

For all haptens, the conjugation was performed by coupling the primary amine function of the carriers with the carboxylic acid function of the hapten after their carbodiimide activation. Briefly, the probes were activated via their carboxylic acid function by a pretreatment in 1,4-dioxane at the concentration of 1.36 g L^{-1} in the presence of 3.9 g L^{-1} *N*-hydroxysuccinimide and 14.8 g L^{-1} *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. After an incubation time of 30 min, the dicyclourea precipitate was eliminated by centrifugation, and 20 μL of the supernatant were added to either (i) 500 μL of a 10 g L^{-1} BSA solution, (ii) 250 μL of a latex-amino beads solution, or (iii) 250 μL of a dextran-amino solution (2 μM). All carrier solutions were prepared in 0.1 M carbonate buffer, pH 11. The obtained solutions were then incubated under stirring for 2 h at room temperature for the coupling process to be completed. The formed BSA-conjugates were then separated from the nonreacted species on a desalting chromatography column (Sephadex G-25 M). The formed latex- and dextran-conjugates were separated from the nonreacted species by successive centrifugation/rinsing cycles using microcon 3000 columns. The conjugates were stored in 0.1 M acetate buffer, KCl 0.1 M, pH 5.5 at 4 $^{\circ}\text{C}$.

These three carriers were used because of their difference in terms of available amino groups and to evaluate the possible cross-reactivity toward carrier. For BSA, there are 59 lysine residues and 30–35 are accessible for the coupling reaction.²³ The polybead amino microspheres contain an unknown number of NH_2 , but they are believed to exhibit a high density of amino groups. The dextran amino contains 146 mol of NH_2 /mol.

In order to characterize the conjugation, the protein conjugates were studied using UV or mass spectrometry, and the determined molar ratio for each pollutant is shown in Supporting Information 1.

Microarray Preparation. The obtained conjugate solutions were spotted with the addition of 0.5 g L^{-1} bromophenol blue as the spotting control. A volume of 0.8 nL of each solution were arrayed with a 450 μm spot to spot pitch in a 49-spots matrix format (7×7 array) on an optical clear pressure sensitive adhesive (TKL, AXO Science, France) using a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany).

For the first part of the study (matrix I) concerning the screening of the conjugates and the selectivity tests, all the conjugates were deposited in duplicates, with triplicates of positive control (alkaline phosphatase labeled streptavidin), and triplicates of seven nonspecific interaction controls (BSA-4-BBA, latex-4-BBA, dextran-4-BBA, BSA, latex, dextran, and bromophenol blue).

For the second part of the study (matrix II) concerning the calibration of the test and the pollutants multiplex detection, the

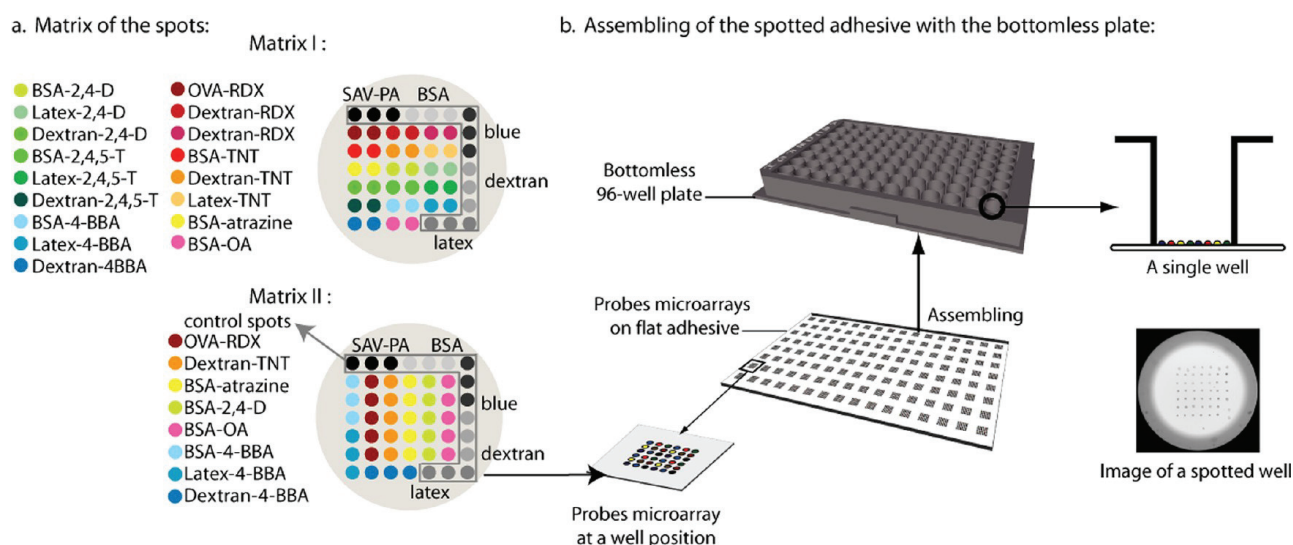


Figure 1. Competitive multiplex immunoassay setup: (a) composition of the different matrixes used and (b) principle of the adhesive microarray assembly with the bottomless plate.

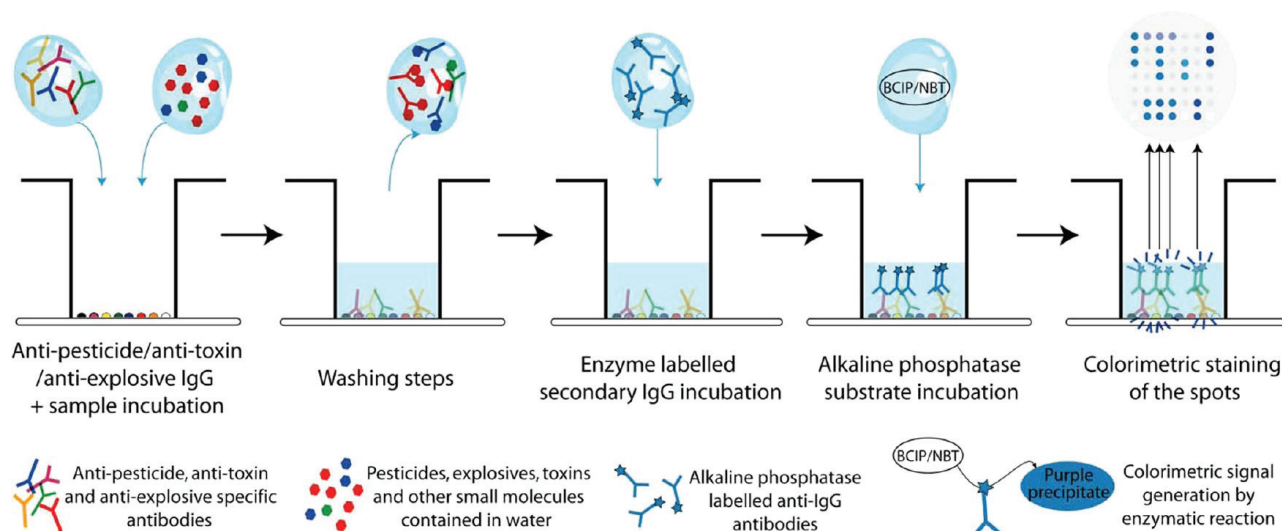


Figure 2. Workflow of the automated competitive multiplex detection of the five pollutants.

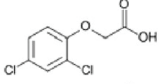
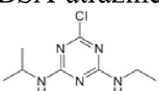
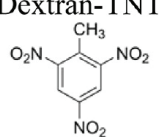
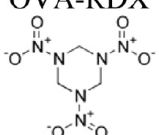
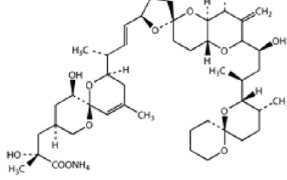
matrix was composed of 5 replicates of the chosen conjugates, one for each pollutant, triplicates of the positive control, and triplicates of the seven nonspecific interaction controls (Figure 1a). The spotted adhesive support was then directly assembled with a bottomless 96-well plate (Greiner bio-one SAS, France) thanks to its adhesive property (Figure 1b).

Automated Immunoassay Protocol. General Protocol. Automated immunoassays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, France) specially equipped with a heater and a washer. The general immunoassay protocol involved the following steps: (i) the microarrays were saturated at 37 °C for 10 min with a 1:5 dilution of LowCross Buffer in phosphate buffer saline (0.1 M, pH 7.4) as a blocking agent to minimize nonspecific interaction signal. (ii) Then, the specific antipesticide, antiexplosive, and antitoxin antibodies in saturation buffer were incubated at 37 °C on the microarrays for 1 h, followed by an incubation with (iii) alkaline phosphatase labeled antimouse IgG antibodies at a concentration of 0.25 mg L⁻¹ in saturation buffer. (iv) Finally,

200 µL of a BCIP/NBT ready-to-use solution were added in each well for signal generation at 37 °C for 30 min. The original color of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the product of the enzymatic reaction generates a purple precipitate on the spots. Between each incubation steps, and at the end of colorimetric revelation, the adhesive in each well was washed 3 times with 400 µL of phosphate buffer saline (PBS).

For colorimetric imaging and signal acquisition, the 96-well plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65 535 arbitrary units (au)) with a 2400 dpi resolution. Image analysis and signal quantification were performed using GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity of a given probe was calculated as the mean intensity of all replicates and corrected using the corresponding control.

Table 1. Selected Hapten-Carrier Conjugates and Their Reactivity with the Different Antibodies

	<i>Anti-2,4-D</i>	<i>Anti-atrazine</i>	<i>Anti-TNT</i>	<i>Anti-RDX</i>	<i>Anti-OA</i>
BSA-2,4-D 	100.00	37.96	3.18	17.65	3.51
BSA-atrazine 	7.15	100.00	3.18	27.45	7.01
Dextran-TNT 	20.64	9.26	100.00	14.70	7.01
OVA-RDX 	9.51	74.95	9.54	100.00	7.03
BSA-OA 	9.51	12.96	6.37	2.94	100.00

Cross reaction : $X < 15\%$; $15\% < X < 30\%$; $X > 30\%$

Automated Direct Immunoassay. The automated protocol used the matrix I microarrays. The only deviation from the general protocol is the first antibodies incubation step (ii), in which concentration ranges of each specific antibody were incubated separately on the microarrays.

Automated Competitive Immunoassay. For this type of assay, the protocol was modified as presented in Figure 2 and used on matrix II microarrays. For the first antibodies incubation step (ii), a mixture of the anti-2,4-D, anti-atrazine, anti-RDX, anti-TNT, and anti-OA specific antibodies at an optimized concentration of 0.1, 0.1, 1, 0.2, and 0.01 mg L⁻¹, respectively, were incubated at 37 °C for 1 h in each well, in the presence of different concentration ranges of each pollutant in order to calibrate the competitive immunoassay.

RESULTS AND DISCUSSION

Multiplex immunoassays involve multiple antibody/target couples, each one having its own optimum working conditions. Furthermore, the probability of cross-talking interferences with all the other couples evolves more than exponentially while the multiplexing number increases.^{24,25} Optimizing multiplex immunoassays can then be rapidly a real experimental nightmare, and the automation/throughput of our assay is then here a real plus to rapidly test multiple assay conditions. In the field of water quality monitoring, except in the case of biological pollutions by pathogens, most of the target molecules are small organic compounds with highly similar structures, usually involving unsaturated aromatic. In the present study, the five target

pollutants (Table 1) are OA, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine (atrazine), 2,4-D, TNT, and RDX, five molecules with strong structural similarities. Since the five pollutants will have to be detected simultaneously using a competitive multiplex assay, it is then worth to foresee strong cross-reactivity issues between the different immobilized haptens and the different specific antibodies. The first step of the development of the multiplex competitive immunoassay was then the optimization of the haptens immobilization and cross-reactivity.

Microarray Preparation. In the described device, the adhesive support plays a double role: it enables one to immobilize microarrays of the hapten conjugates and to assemble these microarrays with the 96-well bottomless microtiter plates. The choice for an adhesive support was based on previous study, comparing polystyrene surfaces classically used for ELISA, porous nitrocellulose/cellulose acetate membrane, and adhesive surface.²⁶ The adhesive surface showed very good results in terms of colorimetric staining with the alkaline phosphatase precipitate and a very low background of nonspecific signal. Moreover, thanks to the support transparency, the colorimetric result was easily recorded. Another additional interesting feature of this adhesive material for probe immobilization is its possible integration in a complex system thanks to fast and easy assembly through its adhesive property.²⁷

Probes Screening toward Selectivity. For the development of the present five-plex immunoassay, we have been screening 17 carrier-hapten conjugates toward their reactivity

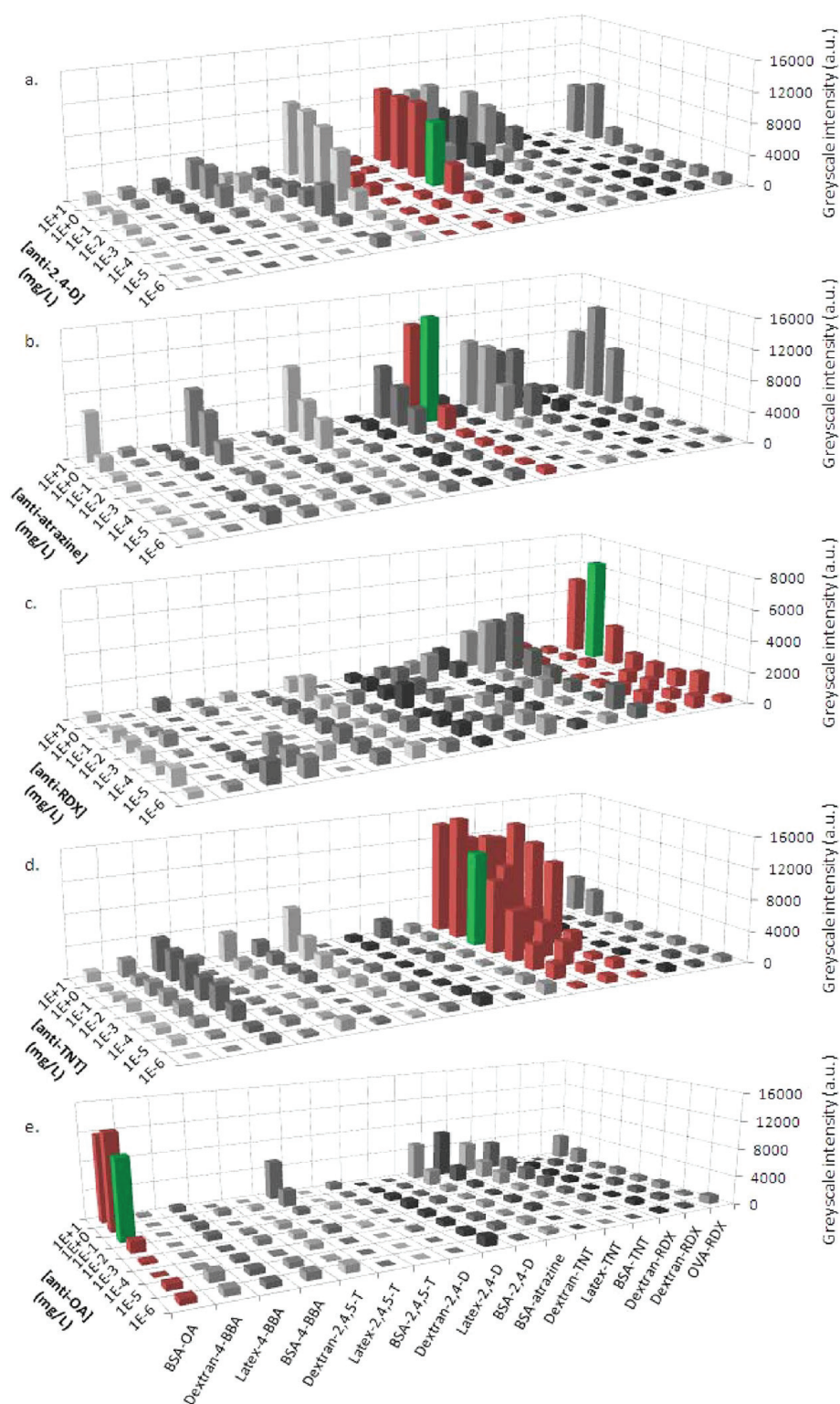


Figure 3. Cross-reactivity study between immobilized probes and antibodies. Graphical representation of the multiplex signals obtained on the different probes as a function of the different antibodies concentrations.

and cross-reactivity with specific antibodies. Different carrier molecules (BSA, OVA, dextran, and latex beads) were used in order to produce the most suitable immobilization platform for each pollutant. Indeed, a strong effect of the probe immobiliza-

tion chemistry is usually observed for the competitive immunoassay of small target molecules (<500 Da). In addition to the five target molecules (atrazine, 2,4-D, RDX, TNT, and OA), two haptens (4-BBA and 2,4,5-T) were chosen for their structural

Table 2. Cross-Reactivity of the Different Antibodies with the Different Analytes in Solution

	<i>BSA-2,4-D</i>	<i>BSA-Atz</i>	<i>OVA-RDX</i>	<i>Dextran-TNT</i>	<i>BSA-OA</i>
2,4-D		51.34	15.66	9.32	0.00
Atz	1.51		18.53	0.00	0.00
RDX	1.06	59.49		0.00	0.00
TNT	13.19	0.00	33.84		0.99
OA	7.21	43.98	22.46	0.00	
Cross reaction : X < 15% ; 15% < X < 30% ; X > 30%					

similarities and potential cross-reactivity with anti-2,4-D antibodies. 4-BBA was used as an additional control, and 2,4,5-T was expected to be valuably used for the detection of its structural analogue 2,4-D. The experiments described below were realized with the optimized conditions, determined thanks to a checkerboard titration of the antigen and antibodies simultaneously (data not shown).

As a first raw experiment, the specific reactivity and cross-reactivity of the 17 carrier-hapten conjugates were evaluated in order to select the conjugates giving the most sensitive result and the lowest cross-reactivity. Figure 3 presents the reactivity profiles of the different conjugates in the presence of increasing concentrations of specific antibodies. This representation enabled us to identify the different cross-reactivities and to select the best compromise between reactivity and specificity. As can be seen in Figure 3, from the 17 tested conjugates, 7 hapten-carriers were giving significant specific signal (BSA-OA, BSA-atrazine, BSA-2,4-D, OVA-RDX, BSA-TNT, latex-TNT, and dextran-TNT). Nevertheless, reactivity was also observed between numerous partners of the assay which force us to finely tune the antibodies concentrations and the hapten-carrier conjugates used.

The minimum signal accepted for the selection of a conjugate and of an antibody concentration was set to 6 000 au, in order to have a strong colorimetric signal for the maximum reactivity, and to be able to clearly see the decrease in competitive format. When looking closely to the profiles, the anti-2,4-D antibodies reacted only with the BSA-2,4-D conjugate and cross-reacted with all the TNT probes, with BSA-atrazine, with OVA-RDX, and with BSA-2,4,5-T but only at a concentration higher than 0.1 mg L⁻¹. The fine-tuning of the anti-2,4-D concentration (0.01 mg L⁻¹, green bar in Figure 3a) permitted then to eliminate the nonspecific signals on the RDX, TNT, and atrazine conjugates. The antiatrazine antibodies cross-reacted with all BSA conjugates, i.e., BSA-OA, BSA-2,4,5-T, BSA-2,4-D, BSA-TNT, and even the BSA-4-BBA control, but also with OVA-RDX and latex-TNT conjugates. The tuning of the antiatrazine antibodies concentration was not a satisfying solution to completely avoid cross-reaction, and the best compromise between reducing cross-reaction and keeping a strong specific signal on BSA-atrazine was then found to be an antiatrazine antibodies concentration of 1 mg L⁻¹ (green bar in Figure 3b). The anti-RDX antibodies reacted only with the OVA-RDX conjugate and slightly cross-reacted with BSA-TNT and with latex-TNT. By selecting an anti-RDX antibodies concentration of 1 mg L⁻¹ (green bar in Figure 3c), a maximum specific signal can be reached while lowering the cross-reaction, except on BSA-TNT and latex-TNT conjugates. The anti-TNT antibodies reacted specifically with all of the TNT-

conjugates and cross-reacted weakly with all of the 2,4,5-T conjugates and with OVA-RDX. The optimization of the anti-TNT antibodies concentration (0.1 mg L⁻¹, green bar in Figure 3d) permitted one to avoid almost all cross-reaction signals while keeping a high enough specific signal. Finally, the anti-OA antibodies were shown to generate strong specific signals and weak cross-reactivity with BSA-atrazine, OVA-RDX, latex-2,4,5-T, and all of the TNT-conjugates. One more time, the selection of an anti-OA antibodies concentration of 0.1 mg L⁻¹ (green bar in Figure 3e) completely circumvents cross-reactivity while keeping a high enough specific signal.

Once the different antibodies concentrations were optimized, the hapten carriers were selected according to the specific signal and cross-reactivity they generated from each specific antibody. BSA-2,4-D, BSA-atrazine, OVA-RDX, dextran-TNT, and BSA-OA were the conjugates giving the highest specific signal, and latex-TNT and BSA-TNT were discarded because of their strong reactivity with anti-RDX and antiatrazine antibodies. The 2,4,5-T conjugates, initially included in the study as an analogue useful for the detection of 2,4-D, was also abandoned because of its large cross-reactivity with other antibodies.

Table 1 presents the selected conjugates and the remaining cross-reactivity levels. As can be seen, significant cross-reactivity still occurred when using antiatrazine or anti-RDX antibodies, anticipating difficulties in the analytical treatment of the competition curves for these two pollutants.

A study of the cross-reactions of the analytes in solution was also performed. For that purpose, a cocktail of all antibodies was incubated with each analyte separately. The results of this study are summarized in Table 2. For each probe, the cross-reactivity or competitive interference of a given analyte with the different antibodies was defined as the percentage of signal decrease at the inflection point of the calibration curve (specific signal corresponding to 50%).¹⁵

According to the previously calculated cross-reactivity of the antibodies with the immobilized probes and the present cross-reactivity with the analytes in solution, the atrazine detection is foreseen to be hardly reliable. This issue shall in future development be specifically targeted. Methods were previously reported in order to evaluate and to avoid most of the cross-reaction issues. For example, Schuetz et al. described the selection of hapten structures for indirect immunosensors array, testing different haptens to obtain the best reactivity and selectivity with anti-TNT and anti-2,4-D antibodies.²⁸ Jones et al. also described the complexity of multianalyte analysis with antibodies and proposed a mathematical method to improve the experimental performance of these immunoassays and applied it to the detection of herbicides.²⁹ Chemometric approaches and

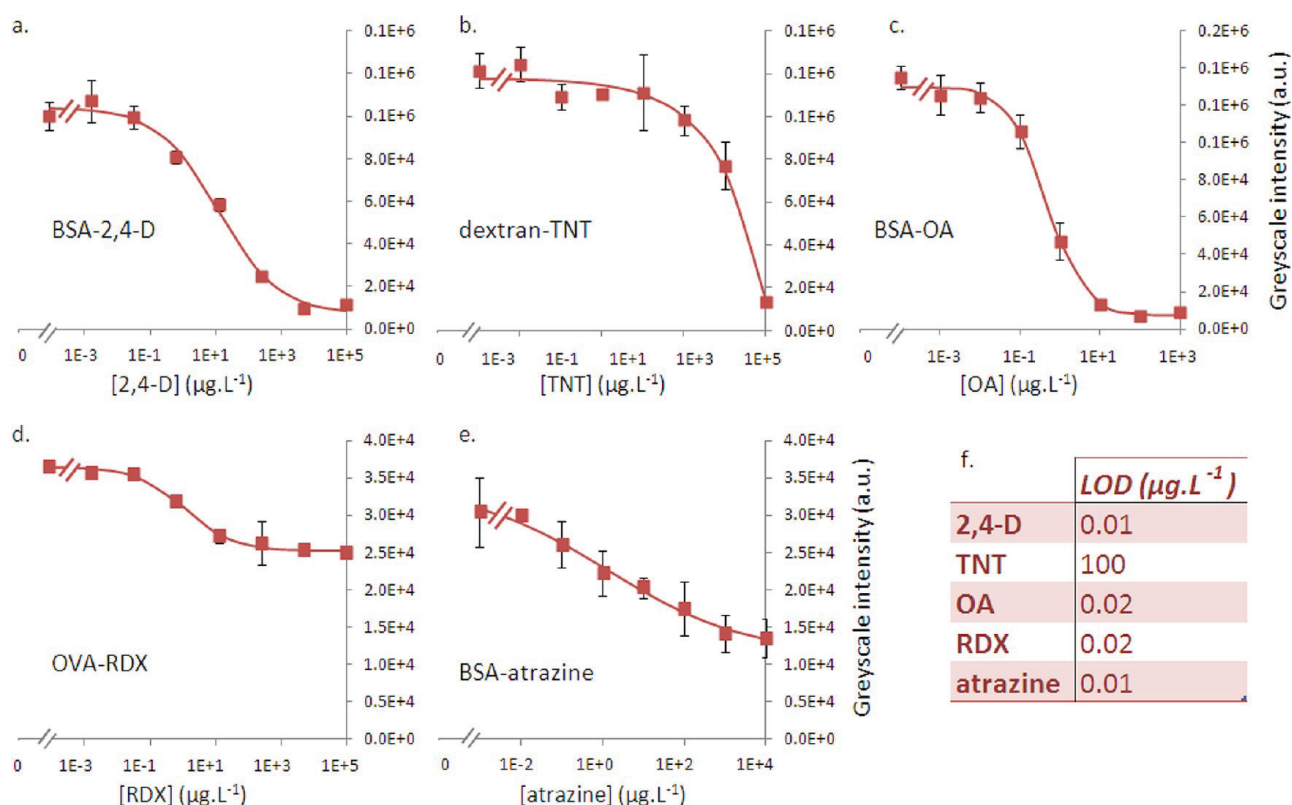


Figure 4. Calibration curves for the competitive detection of (a) 2,4-D, (b) TNT, (c) OA, (d) RDX, and (e) atrazine. Curves were fitted using a four-parameter logistic function. (f) Limits of detection of the different pollutants, calculated using $3 \times$ mean standard deviation.

the use of a recognition pattern to classify the molecular analogue could also be an interesting tool for the determination of cross-reactivities and could improve the reliability of analyte identifications.³⁰

Monoplex Calibration Curves. In order to be able later on to determine in a multiplex format the concentration of the five different pollutants, each of the five assays were calibrated independently using a cocktail of the five specific antibodies and different concentration ranges of the pollutants.

Figure 4 depicts the different calibration curves obtained for the detection of 2,4-D, TNT, OA, atrazine, and RDX. As a matter of fact, the competition occurs for all target molecules and the specific signal obtained on each probe decreases with the pollutant concentration, as expected in a competitive immunoassay. Moreover, the reproducibility of the measurement was high with a signal mean standard deviation of 9.6% (40 measurements, 5 replicates, 2 runs).

Figure 4f presents the limit of detection (LOD) for the five pollutants, determined using the four-parameter logistic fitting (Supporting Information 2). The obtained LOD ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ for TNT, $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ for RDX, $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ for OA, $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ for atrazine, and $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ for 2,4-D) were in good agreement with the EU and U.S. regulations.^{3,5,6} Moreover, the sensitivity of our immunoassays is at least as good as the one obtained with previously described immunosensors using the same antibodies, except for TNT detection.^{15,21,31–33}

Analyzing the atrazine and RDX calibration curves reveals an abnormal behavior at high competitor concentrations. Indeed, even if the signal levels off at high concentrations, it never reaches a zero value (or even close) and still remains at approximately 45% and 70% of the maximum signal for atrazine and RDX,

respectively. These percentages have to be correlated to the highest cross-reactivity observed (Tables 1 and 2) on the different conjugates, which might generate stable signal, even at high competitor concentrations. As can be seen in Figure 3, the OVA-RDX conjugate is the only RDX conjugate that gave a signal with anti-RDX antibodies, but we also found an important cross-reactivity signal with anti-atrazine and anti-2,4-D antibodies. Considering these results, the plateau obtained on the RDX competition curve can be attributed to nonspecific recognition from anti-atrazine and anti-2,4-D antibodies, which are not displaced by RDX in solution. Nevertheless, we chose to keep this probe in our multiplex immunoassay because of its importance for the detection of explosive molecules, and even if the upper limit of quantification is low, our assay still can give qualitative information about the presence or absence of this molecule in the tested samples. The complexity of the involved immunochemical reactions occurring in the present system, i.e., five different antibodies having different cross-reactivity toward five different immobilized haptens, was thus here plainly evidenced.

Pollutants Detection Using the Multiplex Competitive Immunoassay. In order to evaluate the assay performances for the pollutants multiparametric detection with a semiquantitative method, spiked water samples were prepared with various concentrations of the different targets. The composition of the samples is given in Table 3 together with the recovery values (*R*) calculated using the concentrations determined thanks to the equations of the four-parameter fitting curves determined previously (Supporting Information 2).

As can be seen, 82.5% of the spiked concentrations were successfully determined using the present multiplex competitive

Table 3. Recovery Values Obtained during the Multiplexed Detection of Various Spiked Water Samples

Sample #	Pollutant Composition [pollutant] (mg.L ⁻¹)	Recovery R = [pollutant] _{calculated} /[pollutant] _{real}				
		RDX	TNT	atrazine	2,4-D	OA
1	RDX: 0 TNT: 0.5 Atrazine: 0 2,4-D: 0.005 OA: 0		73 %		124 %	
2	RDX: 0.05 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0.05 OA: 0	82 %			107 %	
3	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0.005 2,4-D: 0.5 OA: 0			81 %	103 %	
4	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0.1			~LOD		ULQ ^a
5	RDX: 0 TNT: 1 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0	~LOD	90 %			
6	RDX: 0.01 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0	109 %				
7	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0.01 2,4-D: 0 OA: 0			96 %		
8	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0.1 OA: 0				126 %	
9	RDX: 0 TNT: 0.0005 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0.05		LOD			ULQ ^a
10	RDX: 0.0005 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0.005	129 %				108%
11	RDX: 0.5 TNT: 0.005 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0	101 %	LOD			
12	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0.0005 2,4-D: 0 OA: 0.0005			LOD		115 %
13	RDX: 0 TNT: 0.05 Atrazine: 0.005 2,4-D: 0 OA: 0		LOD	126 %		
14	RDX: 0.005 TNT: 0 Atrazine: 0.05 2,4-D: 0 OA: 0	130 %		121 %		
15	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0.0005 OA: 0.00005				LOD	LOD
16	RDX: 0 TNT: 0 Atrazine: 0 2,4-D: 0 OA: 0					

^a ULQ : real value are higher than the upper limit of quantification.

Overestimated:	3.75 %
Significantly different:	13.75 %
Successfully determined:	82.5 %

assay (green boxes in Table 3). Matching concentrations were defined as significantly close values (i.e., $85\% \leq R \leq 115\%$). Moreover, every spike concentration known to be lower than the LOD of a particular target were considered to be successfully determined when a zero value was calculated.

Besides, 13.75% of the calculated concentrations were found to be significantly different but not incoherent ($70\% \leq R < 85\%$ and $115\% < R \leq 130\%$) from the spiking values (orange boxes in Table 3). Then, 3.75% of the concentrations were overestimated ($R < 70\%$ and $R > 130\%$), leading to false positive results (red boxes in Table 3). Interestingly, atrazine was the only target to generate a false positive but only in the presence of RDX, 2,4-D, or TNT, evidencing one more time the impact of the cross-reactivity of the antiatrazine with the other haptens and analytes (Tables 1 and 2) on the analytical results.

CONCLUSIONS

In this proof of concept study, we demonstrated the applicability of an adhesive-based microarray in a 96-well plate format for the multiparametric detection of three different types of small molecule water pollutants.

The optimization of the immobilized probes, of the protocol conditions, and of the cross-reactions was highly facilitated thanks to the fully automated protocol possible only because of the standard architecture of the tool (96-well plate). Moreover, with less than 3 h assay duration for 96 samples and whatever the number of parameter determined, our system was shown to be compatible with high-throughput requirements.

Nevertheless, as expected when dealing with multiplex immunoassays, cross-reactivity of the assay components was a real bottleneck. The optimization of the assay conditions and hapten-carrier compositions helped us partially overcome this problem, but interferences still remain which are generating false positive results.

In previous reports, the Pla-Roca group proposed an interesting approach based on antibody colocalization in order to surmount the major issue of cross-reaction in multiparametric immunoassays.²⁵ With their system, the specific antibodies did not interact with each other or with the other probes and the cross-reactions are avoided. Another alternative, possible only when using the present adhesive microarray, shall be to combine the multiplexing properties of the microarray with the ultrahigh throughput of a 384 or 1536-well plate.³⁴ Separating the cross-reacting species in different microwells shall then lead to more accurate analytical results while keeping the multiplex analysis possible. Indeed, up to 100 spots per well can be obtained in 384 format and 25 in a 1536 format. This is clearly an interesting avenue for future developments of the present water monitoring system.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Milan Franek for the anti-2,4-D supply and to Prof. Stefano Girotti and co-workers for the ovalbumin-RDX and dextran-RDX supplies. This work has been supported in part by the European Commission Program STREP - FP7-SEC-2010-1-Bomb Factory Detection by Networks of Advanced Sensors.

REFERENCES

- (1) European Food Safety Authority. *Eur. Food Saf. Authority J.* **2008**, 589, 1–62.
- (2) Levine, B. S.; Furedi, E. M.; Gordon, D. E.; Barkley, J. J.; Lish, P. M. *Fund. Appl. Toxicol.* **1990**, 15, 373–380.
- (3) Standards Division Office of Drinking Water Report; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1988.
- (4) Shankaran, D. R.; Kawaguchi, T.; Kim, S. J.; Matsumoto, K.; Toko, K.; Miura, N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1313–1320.
- (5) Off. J. Eur. Communities, **1998**; pp 32–54.
- (6) U.S. National Primary Drinking Water Regulations 40CFR141; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1999.
- (7) Office of Ground Water and Drinking Water Report; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, 2000.
- (8) Office of Ground Water and Drinking Water Report; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, 2005.
- (9) Office of Research and Development National Homeland Security Research Center Research Report; U.S. Environmental Protection Agency 2005.
- (10) Meaney, M. S.; McGuffin, V. L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 2557–2576.
- (11) Singh, S. J. *Hazard. Mater.* **2007**, 144, 15–28.
- (12) Li, H.; Wang, J. X.; Pan, Z. L.; Cui, L. Y.; Xu, L. A.; Wang, R. M.; Song, Y. L.; Jiang, L. J. *Mater. Chem.* **2010**, 21, 1730–1735.
- (13) Chen, W.; Wang, Y.; Bruckner, C.; Li, C. M.; Lei, Y. *Sens. Actuators, B: Chem.* **2010**, 147, 191–197.
- (14) Mallat, E.; Barcelo, D.; Barzen, C.; Gauglitz, G.; Abuknesha, R. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 124–132.
- (15) Anderson, G. P.; Moreira, S. C.; Charles, P. T.; Medintz, I. L.; Goldman, E. R.; Zeinali, M.; Taitt, C. R. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2279–2285.
- (16) Shlyapnikov, Y. M.; Shlyapnikova, E. A.; Simonova, M. A.; Shepelyakovskaya, A. O.; Brovko, F. A.; Komaleva, R. L.; Grishin, E. V.; Morozov, V. N. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 5596–5603.
- (17) Bhand, S.; Surugiu, I.; Dzgoev, A.; Ramanathan, K.; Sundaram, P. V.; Danielsson, B. *Talanta* **2005**, 65, 331–336.
- (18) Wang, Y.; Liu, N.; Ning, B. A.; Liu, M.; Lv, Z.; Sun, Z. Y.; Peng, Y.; Chen, C. C.; Li, J. W.; Gao, Z. X. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 34, 44–50.
- (19) Girotti, S.; Ferri, E.; Maiolini, E.; Bolelli, L.; D'Elia, M.; Coppe, D.; Romolo, F. S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 313–320.
- (20) Morais, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Arnandis-Chover, T.; Puchades, R.; Maquieira, A. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5646–5654.
- (21) Weller, M. G.; Schuetz, A. J.; Winklmair, M.; Niessner, R. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 393, 29–41.
- (22) Marquette, C. A.; Coulet, P. R.; Blum, L. J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 398, 173–182.
- (23) Muller, S.; Regenmortel, M. H. V. V.; Muller, S. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; Elsevier, 1999; Vol. 28, pp 79–131.
- (24) Luo, W.; Pla-Roca, M.; Juncker, D. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 5767–5774.
- (25) Pla-Roca, M.; Leulmi, R. F.; Tourekhanova, S.; Bergeron, S.; Laforte, V.; Moreau, E.; Gosline, S. J. C.; Bertos, N.; Hallett, M.; Park, M.; Juncker, D. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, DOI: 10.1074/mcp.M111.011460.

- (26) Le Goff, G. C.; Corgier, B. P.; Mandon, C. A.; De Crozals, G.; Chaix, C.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *35* (1), 94–100.
- (27) Corgier, B. P.; Mandon, C. A.; Le Goff, G. C.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Lab Chip* **2011**, *11*, 3006–3010.
- (28) Schuetz, A. J.; Winklmaier, M.; Weller, M. G.; Niessner, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, *363*, 625–631.
- (29) Jones, G.; Wortberg, M.; Hammock, B. D.; Rocke, D. M. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *336*, 175–183.
- (30) Cheung, P. Y. K.; Kauvar, L. M.; Engqvistgoldstein, A. E.; Ambler, S. M.; Karu, A. E.; Ramos, L. S. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *282*, 181–192.
- (31) Franek, M.; Kolar, V.; Granatova, M.; Nevorankova, Z. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1369–1374.
- (32) Girotti, S.; Eremin, S.; Montoya, A.; Moreno, M. J.; Caputo, P.; D'Elia, M.; Ripani, L.; Romolo, F. S.; Maiolini, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 687–695.
- (33) Rabbany, S. Y.; Lane, W. J.; Marganski, W. A.; Kusterbeck, A. W.; Ligler, F. S. *J. Immunol. Methods* **2000**, *246*, 69–77.
- (34) Mandon, C. A.; Berthuy, O. I.; Corgier, B. P.; Le Goff, G. C.; Faure, P.; Marche, P. N.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *39*, 37–43.

Supporting information 1. Characterization of the conjugates

Conjugate	Molar ratio	Characterization method
BSA-2,4-D	4	ESI-QTOF Mass spectrometry
BSA-2,4,5-T	4	ESI-QTOF Mass spectrometry
BSA-4-BBA	5	ESI-QTOF Mass spectrometry
BSA-Atrazine	N.D.	ESI-QTOF Mass spectrometry
OVA-RDX	5	UV spectrometry
BSA-TNT	3	ESI-QTOF Mass spectrometry
BSA-OA	1	ESI-QTOF Mass spectrometry

Supporting information 2. Four-parameters logistic fitting

parameters	A	B	C	D	RMSE
2,4-D	1.04E+06	4.71E-01	1.21E-02	7.03E+04	31252.15
Atrazine	3.40E+05	2.57E-01	1.38E-03	1.12E+05	6191.97
RDX	3.64E+05	5.89E-01	1.15E-03	2.52E+05	3054.48
TNT	1.18E+06	3.77E-01	6.26E+13	-2.94E+10	42618.76
OA	1.30E+06	9.15E-01	4.53E-04	7.13E+04	24807.11

Curves equation : $y = d + (a-d) / (1,0 + (x/c)b)$

2.4. ETUDE COMPLEMENTAIRE : COMPARAISON AVEC UN ELISA CLASSIQUE

Dans l'étude précédente, nous avons présenté la preuve de concept de l'application d'un outil d'analyse multiparamétrique haut-débit pour la détection de petites molécules pour le contrôle environnemental. L'objectif de cette étude complémentaire est de comparer cet outil à des tests ELISA classiques, par rapport à leurs avantages et inconvénients d'un point de vue de la préparation et de la mise en œuvre de l'analyse mais aussi de leurs performances analytiques.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont décrits dans l'article suivant.

❖ Article 4. MULTIPLEX MICROARRAY ELISA VERSUS CLASSICAL ELISA, A COMPARISON STUDY OF POLLUTANT SENSING FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS

Cloé Desmet, Loïc J. Blum et Christophe A. Marquette

Environmental Science: Processes & Impacts, 2013, 15, 1876–1882.

Cette étude complémentaire porte sur le développement, l'optimisation et la comparaison des performances entre l'immunoessai multiparamétrique en format puce à petites molécules précédemment décrit, et trois immunoessais monoparamétriques en format ELISA, pour la détection de 3 polluants : un explosif, une toxine et un pesticide. Les caractéristiques des deux types de systèmes ont tout d'abord été évaluées en termes de coûts, de consommation de réactifs et de durée du protocole. Le 2,4-D, le TNT et l'acide okadaïque sélectionnés comme cibles ont été immobilisés dans des puits de micro-plaque 96 puits classique, ou selon une matrice à la surface d'un support adhésif intégré à une plaque 96-puits sans fond. Une fois les deux systèmes optimisés, leurs performances ont été évaluées et comparées en termes de limite de détection, IC50, gamme de linéarité et reproductibilité.

Les tests ELISA classiques, avec des limites de détection allant jusqu'à 10 µg/L se sont avérés moins sensibles que les tests en immunoessai multiparamétrique, avec des limites de détection atteignant 0,01 µg/L. En outre, au delà des caractéristiques avantageuses apportées par le multiplexage en termes de coûts et de temps de préparation et de réalisation de l'analyse, le test sur puce s'est également révélé être plus reproductible. Dans les mêmes conditions, avec le même nombre de cibles et de réplicats, 6 heures sont nécessaires à la réalisation complète du protocole pour un test ELISA sur 3 échantillons, au lieu de 3 heures pour l'analyse de 96 échantillons avec l'outil multiparamétrique.

PAPER

Multiplex microarray ELISA versus classical ELISA, a comparison study of pollutant sensing for environmental analysis

Cite this: *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2013, **15**, 1876

Cloé Desmet,^a Loïc J. Blum^a and Christophe A. Marquette^{*ab}

The present study describes the development, optimization and performance comparison of three ELISAs and one multiplex immunoassay in a microarray format. The developed systems were dedicated to the detection of three different classes of pollutants (pesticide, explosive and toxin) in water. The characteristics and performances of these two types of assays were evaluated and compared, in order to verify that multiplex immunoassays can replace ELISA for multiple analyte sensing. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,6-trinitrotoluene and okadaic acid were chosen as model targets and were immobilized in classical microtiter plate wells or arrayed at the surface of a microarray integrated within a classical 96-well plate. Once optimized, the classical ELISAs and microarray-based ELISA performances were evaluated and compared in terms of limit of detection, IC_{50} , linearity range and reproducibility. Classical ELISAs provided quite good sensitivity (limit of detection down to $10 \mu\text{g L}^{-1}$), but the multiplex immunoassay was proven to be more sensitive (limit of detection down to $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$), more reproducible and an advantageous tool in terms of cost and time expenses. This multiplex tool was then used for the successful detection of the three target molecules in spiked water samples and achieved very promising recovery rates.

Received 10th June 2013

Accepted 26th July 2013

DOI: 10.1039/c3em00296a

rsc.li/process-impacts

Environmental impact

The present report intends to compare, side by side, three classical competitive ELISA for the detection of 3 water pollutants (2,4-D, TNT and okadaic acid) with a multiplex competitive immunoassay using microarrays in a 96-well format. This is the first report about such comparison for competitive immunoassays and the conclusions are that the microarray performances and time/reagent consumption are indeed quite competitive. Such low cost and high-throughput assays are of great interest for water environmental monitoring, and we believe that demonstrating their advantages will help disseminate their use amongst the environmental analysis community.

Introduction

Environmental and more particularly water contamination by small molecule pollutants is nowadays a major issue worldwide. Pesticides, explosives, toxins and other types of contaminants can be found together in water because of their extensive use in different activities such as agriculture, pharmaceutical and chemical industries, military or terrorist activities. These different types of molecules were proven to be toxic for humans, indeed the Environmental Protection Agency (EPA) has stated that some explosives such as TNT are possible human carcinogens, toxins may cause severe gastrointestinal disorders, and

pesticides are a real public health issue. For now, the maximum concentration allowed for common pesticides was set to $3 \mu\text{g L}^{-1}$ by EPA for example. Because of their dangerous effects to human health and wildlife,^{1–3} there is a large and growing demand for sensors capable of accurate and rapid detection of these different types of pollutants.

Many different methods have already been proposed for pollutant detection. Chromatography (high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC)), mass spectrometry (MS), and capillary electrophoresis (CE) are the most commonly used methods. For instance, EPA recommends GC-MS and GC-ECD (electron capture detector) for the analysis of some pesticides in water samples.^{4–6} Nevertheless, these methods are still time-consuming and rely on sophisticated equipment and laborious sample preparation. Moreover, only a few of these techniques were able to detect concomitantly different sources of pollution.

Alternative techniques were then developed in order to improve the ease of pollutant sensing. Several electrochemical,

^aEquipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1 – CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE – 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; Fax: +33 472 44 79 70; Tel: +33 472 43 13 69

^bAXO Science SAS, 66 Bd Niels Bohr, CEI 1, 69100 Villeurbanne, France. E-mail: christophe.marquette@axoscience.com; Tel: +33 478 93 08 26

mass (such as surface acoustic wave or microcantilever-based systems), fiber optic, spectrophotometric, and bio-sensors have then been developed lately, enabling the achievement of good sensitivity in the detection of each of these pollutants.^{7–10} Among the biosensors described, the most studied and promising systems are the immunosensors,^{11–19} which are the integrated version of classical Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), the gold standard assay format for numerous analytical applications. Nevertheless, ELISAs are time and reagent-consuming methods, and techniques with reduced costs and detecting several targets at the same time are preferred, because of the possibility of simultaneous presence of some pollutants. Recently, some multiplex immunoassays have been described, enabling the specific and concomitant detection of a few targets.²⁰ These systems were in most cases based on microarray technology but their analytical performances were rarely compared to the corresponding classical ELISA tests.¹²

In the present study, we describe and compare the performances of three ELISA tests for the detection of three model pollutant targets (one pesticide: 2,4-D, one explosive: TNT and one toxin: okadaic acid) with a multiparametric immunoassay in a microarray format. The 96-well format of the classical ELISA was used also for the microarray immunoassay, maintaining as much as possible the advantages of the classic format while adding the multiplex capacity.²¹

Materials and methods

Pollutants, antibodies and reagents

Dextran amino (500 000 Da) was supplied by Life Technologies, United Kingdom. BCIP/NBT, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-benzoylbenzoic acid (4-BBA), okadaic acid (OA) from Prorocentrum concavum, picrylsulfonic acid (TNBS) solution 1 M in H₂O, bovine serum albumin (BSA) and alkaline phosphatase labeled anti-mouse IgG (Fc specific) antibodies developed in goat were obtained from Sigma-Aldrich, France. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) was purchased from LGC Standards, France. Anti-TNT A1 monoclonal antibodies developed in mouse were supplied by Strategic Diagnostics, USA. Anti-okadaic acid 7E1 monoclonal antibodies developed in mouse were purchased from Santa Cruz Biotechnology, USA. Alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG antibodies (H + L) developed in goat and peroxidase-labeled anti-mouse IgG antibodies (H + L) developed in goat were supplied by Jackson Immuno-Research, USA. LowCross-Buffer was purchased from Candor Bioscience, Germany. Anti-2,4-D E2G2 monoclonal antibodies were kindly provided by Dr Milan Franek.²² The standards and spiked samples were prepared in double distilled water.

Hapten-carrier conjugate synthesis

In order to immobilize small molecule hapten probes (about 300 g mol⁻¹ for 2,4-D and TNT and 800 g mol⁻¹ for OA) on the bottom of a microtiter plate well or a microarray surface, conjugates of higher molecular weights were synthesized, according to a previously described protocol.²³ Four different

haptens (one pesticide: 2,4-D; one explosive: TNT; one toxin: OA and one control: 4-BBA) were conjugated to different carriers; dextran-amino for TNT and BSA for 2,4-D, 4-BBA and OA. Carriers were chosen according to a previously published study.²³

For all haptens, the conjugation was performed by coupling the primary amine function of the carriers to the carboxylic acid function of the hapten after carbodiimide activation. Briefly, the probes were activated *via* their carboxylic acid function by a pre-treatment in 1,4-dioxane at a concentration of 1.36 g L⁻¹ in the presence of 3.9 g L⁻¹ *N*-hydroxysuccinimide and 14.8 g L⁻¹ *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide. After an incubation time of 30 minutes, the dicyclourea precipitate was eliminated by centrifugation and 20 µL of the supernatant were added to either 500 µL of a 10 g L⁻¹ BSA solution or 250 µL of a dextran-amino solution (2 µM). The carrier solutions were prepared in 0.1 M carbonate buffer, pH 11. The obtained solutions were then incubated under stirring for two hours at room temperature for the coupling process to be completed. The formed BSA-conjugates were then separated from the non-reacted species on a desalting chromatography column (Sephadex G-25 M). The formed dextran-conjugates were separated from the non-reacted species by successive centrifugation/rinsing cycles using a MicroCon 3000. The conjugates were stored in 0.1 M acetate buffer, KCl 0.1 M, pH 5.5 at 4 °C.

Classical ELISA

Binding assay. The classical ELISA tests were performed using a chemiluminescent detection system based on peroxidase labelled secondary antibodies. The ELISA tests were carried out in white ELISA plates (Nunc MaxiSorp™, <http://www.nuncbrand.com>) using a heater unit (Eppendorf). The protocol involved the following steps: (i) the plates were coated for two hours at 37 °C with conjugate solutions at a concentration of 50 µg mL⁻¹ for the BSA-conjugates and 0.1 µM for the dextran-conjugate. (ii) The wells were then saturated at 37 °C for one hour with a saturation buffer composed of 1 : 5 dilution of LowCross Buffer in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, as a blocking agent, able to minimize the non-specific interaction signal. (iii) Then, different concentrations of anti-2,4-D, anti-TNT and anti-OA antibodies in saturation buffer were incubated separately at 37 °C for one hour, followed by (iv) an incubation with horseradish peroxidase labelled anti-mouse IgG antibodies at a concentration of 0.6 mg L⁻¹ in saturation buffer at 37 °C for one hour. (v) The plates were finally washed three times with 0.1 M veronal buffer saline, pH 8.5 (VBS). Between each incubation step, the plates were washed three times with PBS.

For signal generation and reading, the plates were introduced into a luminescent plate reader (LabSystem, France). The light emission was recorded after the injection in each well of 100 µL of VBS containing 200 µM of luminol, 500 µM of hydrogen peroxide and 200 µM of *p*-iodophenol.

Competitive assay. For the competitive assay to take place in the classical ELISA format, the step (iii) of the protocol was modified as follows: the first antibodies were incubated at an

optimized concentration of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the presence of different concentrations of the three pollutants, at 37°C for one hour. For the rest of the protocol and for the signal generation and reading, the process was the same as for the binding assay.

Microarray preparation

In order to create microarrays, conjugate solutions were spotted at a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the BSA-conjugates and $0.1 \mu\text{M}$ for the dextran-conjugate, with addition of 0.5 g L^{-1} bromophenol blue as spotting control. 0.8 nL of each solution were arrayed with a $450 \mu\text{m}$ spot to spot pitch in a 49-spot matrix format (7×7 array) on an optical clear pressure sensitive adhesive (TKL™, AXO Science, France) using a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany). The matrix was composed of six replicates of the pollutant conjugates, with triplicates of a positive control (alkaline phosphatase labelled streptavidin), and triplicates of five non-specific interaction controls (BSA-4BBA, dextran-4BBA, BSA, dextran and bromophenol blue).

The spotted adhesive support was then directly assembled with a bottomless 96-well plate (Greiner bio-one SAS, France) thanks to its adhesive property.

Microarray immunoassay

Binding assay. The microarray-based ELISA tests were performed using a densitometric detection system based on alkaline phosphatase labelled secondary antibodies. Automated multiplex immunoassays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, France) specially equipped with a heater and a washer, as previously described.²³ The protocol involved the following steps: (i) the microarrays were saturated at 37°C for 10 minutes with a 1 : 5 dilution of LowCross Buffer in PBS as a blocking agent to minimize non-specific interactions. (ii) Then, different concentrations of specific anti-pesticide, anti-explosive and anti-toxin antibodies in saturation buffer were incubated at 37°C on the microarrays for one hour, followed by incubation with (iii) alkaline phosphatase labelled anti-mouse IgG antibodies at a concentration of 0.25 mg L^{-1} in saturation buffer. (iv) Finally, $200 \mu\text{L}$ of a BCIP/NBT ready-to-use solution were added into each well for signal generation at 37°C for 30 minutes. The original colour of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the product of the enzymatic reaction generates a purple precipitate on the spots. Between each incubation step, and at the end of colorimetric revelation, the adhesive in each well was washed three times with $400 \mu\text{L}$ PBS.

For colorimetric imaging and signal acquisition, the 96-well plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65 535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution. Image analysis and signal quantification were performed using GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity of a given probe was calculated as the mean intensity of all replicates and corrected using the corresponding control.

Competitive immunoassay. For the competitive assay to take place in the microarray-based format, step (ii) of the protocol was modified as follows: the first antibodies were incubated at an optimized concentration of $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ for anti-2,4-D antibody incubations, and of $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ for anti-TNT and anti-OA antibodies, in the presence of different concentrations of the three pollutants, at 37°C for one hour. For the rest of the protocol and for colorimetric imaging and signal acquisition, the process was the same as for the binding assay.

Comparative parameter determination

In order to compare classical ELISA and microarray-ELISA, different parameters were determined. First, time and volume reagent are needed along with the costs. Then, the sensitivity of the two types of assay was evaluated thanks to the limits of detection (LODs), IC_{50} and linearity range of the quantification. The curves of the signal as a function of the pollutant concentration (fitted using a four parameters logistic function (1)) enabled the determination of the LODs, calculated using a $3 \times$ mean standard deviation, IC_{50} and linearity range (using the logit equation).

$$y = d + (a - d)/(1.0 + (x/c)^b) \quad (1)$$

Finally, the recovery R was calculated for the multiplex analysis.


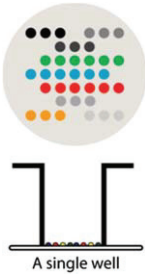
$$R = [\text{pollutant}]_{\text{calculated}}/[\text{pollutant}]_{\text{real}}$$

Results and discussion

Introducing remarks

In the field of environmental and water quality monitoring, immunoassays can be considered, together with chromatographic methods, as the gold standard tools for pollutant sensing. Nevertheless, since numerous types of pollutants can now be concomitantly present in samples, devices enabling the multiplex detection of several pollutants are required. Such devices can be the classical monoparameter ELISAs which are the easiest to develop and implement but microarray-based systems have the capacity to combine, in a single assay, the detection of multiple parameters. Table 1 gives an overview of the similarities and differences between the two techniques, each using a classic 96-well format. As a matter of fact, from a system developer's point of view, the major difference between ELISA and microarray immunoassay is about the immobilization of the probes on the surface of the support. Indeed, coating of entire wells with the probes is necessary to prepare classical ELISA whereas in a microarray format numerous probes can be immobilized in a matrix of spots in the same well. For this first step, at least $50 \mu\text{L}$ of probe solution are necessary per well for the coating, instead of a few nanoliters for each spot in microarrays. Then, since in a microarray format all probes are present in a single well, all parameters can be tested together using only one well whereas numerous wells need to be replicated in a standard ELISA format. For example, when using a 9 probes

Table 1 Standard ELISA versus microarray-based ELISA for a triplex test

	Standard ELISA format	Microarray ELISA format
		
Preparation step	Coating	Spotting
Preparation duration time	15 min + 2 h (hands on time + coating)	15 min
Cost of the preparation apparatus	Low	High
Probe solution volume per well	50 µL	0.8 nL
Number of wells for each condition	33 wells (6 × 3 specific, 3 × 5 negative controls)	1 well, 9 different spots (6 × 3 specific + 3 × 1 positive control + 3 × 5 negative controls)
Reagent volume per well	50 µL	50 µL
Total reagent volume per step	1650 µL	50 µL
Signal generation duration per plate	30 s	30 min
Signal acquisition duration per plate	30 min	30 s
Cost of the signal acquisition apparatus	High	Low
Total duration of the protocol	~6 h	~3 h
Number of samples analyzed per test	2–3	96

microarray, for a condition tested in one well containing the microarray, it is necessary to use 18 different wells in ELISA. Required reagent volumes are then increased together with the preparation time of each step of the assay. Moreover, with less than three hours duration for 96 samples, whatever the number of parameters determined, the present microarray system is compatible with high-throughput requirements whereas in ELISA, the number of samples that could be simultaneously analyzed is lower, because more than one well is required for the analysis of each sample. Compared to standard ELISA, immunoassay in a microarray format demonstrates then *a priori* lot of advantages, but all of these improvements have to be accompanied by the preservation of the immunoassay sensing performances.

ELISA for pollutant sensing

The first part of our study is focused on the optimization of multiple ELISAs and on the evaluation of their performances for pollutant sensing (2,4-D, TNT and OA). This first study involved two steps: a first row of experiments in which binding assays were intended to determine the optimal concentrations of anti-pollutant specific antibodies. Then, competitive assays were performed in order to generate calibration curves and determine IC_{50} values, limits of detection (LODs) and linearity ranges for the three assays. These standard ELISAs were performed using a chemiluminescent labelling system, known to be one of the most sensitive methods for immunoassay detection.

The curves presenting the evolution of the luminescent signal as a function of the antibody concentration are presented in Fig. 1a. As a matter of fact, the binding curves exhibit the classical sigmoid feature. Moreover, from control wells coated without probes, the non-specific signal was found to be not measurable, proof of the specificity of the different antibodies.

From this first row of results, concentrations of 0.1 mg L^{-1} were chosen as optimum for anti-2,4-D, anti-TNT and anti-OA antibodies. These concentrations were chosen in order to

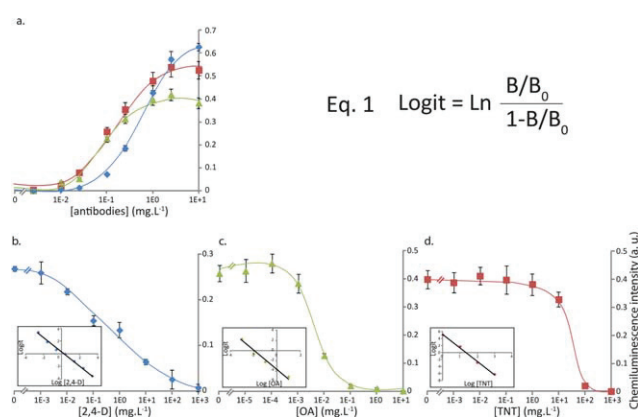


Fig. 1 (a) Evaluation of the chemiluminescent signal with the concentration of specific antibody for each analyte. Standard ELISA calibration curves for the detection of (b) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), (c) okadaic acid (OA) and (d) 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).

generate a sufficiently high detection signal in the steeper part of the binding curve.

The competitive assays using these optimum conditions (Fig. 1b to d) enabled the determination of IC_{50} values, LODs and linearity ranges for the three pollutants. For 2,4-D and OA, competitive assays showed very good performances with $10 \mu\text{g L}^{-1}$ LOD and IC_{50} of 1 mg L^{-1} . For TNT, the competitive detection was less efficient with a determined LOD and IC_{50} of 10 mg L^{-1} and 100 mg L^{-1} , respectively. Eqn (1) was then used to linearize the calibration curves and evaluate the linearity range of the pollutant quantification. Linear ranges from $10 \mu\text{g L}^{-1}$ to 1 g L^{-1} , from $10 \mu\text{g L}^{-1}$ to 10 mg L^{-1} and from 10 mg L^{-1} to 1 g L^{-1} were found for 2,4-D, OA and TNT, respectively. Even if the sensitivity achieved with these ELISAs was lower than that previously described by other groups (LOD down to $6\text{--}20 \text{ ng L}^{-1}$),^{24–27} the LOD obtained using these three ELISAs was in good agreement with the EU and US regulations,^{28–30} but as demonstrated in Table 1 determining three compounds at the same time was really time and reagent consuming.

Microarray ELISA for pollutant sensing

In order to be able to compare the performances of the classical ELISAs *versus* the developed microarray, identical target conjugates and antibodies were used. Moreover, in order to build comparable tests, the classical 96-well format was also used in the microarray-based set-up. In this system, an adhesive is used as an immobilization support for the microarray. This adhesive support plays a double role: it enables the immobilization of microarrays of the hapten conjugates and assembly of these microarrays with the 96-well bottomless microtiter plates. The choice of an adhesive support was based on a previous study, comparing polystyrene surfaces classically used for ELISA, porous nitrocellulose/cellulose acetate membrane and adhesive surface.³¹ The adhesive surface showed very good results in terms of colorimetric staining using an alkaline phosphatase label, and very low background and non-specific signal. Moreover, thanks to the material transparency, the colorimetric results were easily recorded.²¹ Densitometry detection was here chosen for its ease of use and low cost when compared to chemiluminescent imaging systems.

In order to develop the multiplex test using the system described above, two studies, quite similar to the ones performed for the standard ELISAs, were carried out. First, a series of binding assay experiments was intended to determine the optimal concentrations of anti-pollutant specific antibodies. Then, competitive assays were performed in order to generate calibration curves and determine IC_{50} values, limits of detection (LODs) and linearity ranges for the triplex assays.

The curves representing the variation of the signal intensity as a function of the specific anti-pollutant antibody concentration are presented Fig. 2a. Here again, the binding curves exhibit the classical sigmoid feature. Optimum concentrations of 0.01 mg L^{-1} , 0.1 mg L^{-1} and 0.1 mg L^{-1} were chosen for anti-2,4-D antibodies, anti-TNT and anti-OA antibodies, respectively. In the particular case of the microarray-based test, these optimum concentrations were chosen in order to generate a

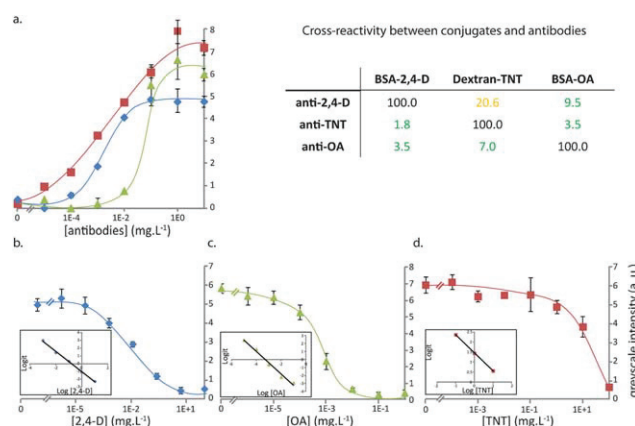


Fig. 2 Microarray-based ELISA for the calibration of antibody concentration (a) and for the detection of (b) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), (c) okadaic acid (OA) and (d) 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Inset table: cross-reactivity in percent of the maximum signal.

sufficiently high detection signal in the steeper part of the binding curve but also in order to lower as much as possible the cross reactivity of the antibodies with the different conjugates present in the microarray.

Indeed, during multiplex analysis using microarray, cross-reactivity issues usually occurred due to the large number of different antibodies present in the test solution (four different antibodies in our case). Indeed, cross-reactivity is the main obstacle in multi-analyte detection by immunoassay and is often described in multiplex immunoassay development.^{23,32–34} Such cross-reactivity of the anti-2,4-D, anti-TNT and anti-OA has been already evaluated in a previous study²³ and these results were compiled in order to select the best conditions for the present system. Nevertheless, cross-reactivity remains and was quantified (Fig. 2, inset table) for each conjugate, and expressed in percent of the maximum signal. The calculated cross-reactivity was low for anti-OA and anti-TNT antibodies, and more important but still acceptable between anti-2,4-D antibodies and dextran-TNT.

Using the determined optimum conditions, competitive detections of the three targets were performed. The results obtained with different concentration ranges of the targets are presented in Fig. 2b to d. The microarray-based competitive immunoassay showed very good performances with LODs of $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ and IC_{50} of $20 \mu\text{g L}^{-1}$ and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ for 2,4-D and OA, respectively. One more time, TNT detection was found to be less effective with a LOD of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ and an IC_{50} of 2 mg L^{-1} . The chemiluminescent or colorimetric signal obtained on dextran-TNT as a function of anti-TNT concentration demonstrated a good recognition of the conjugate by the specific antibody. The lack of sensitivity of the TNT detection could then be explained by a higher affinity of the antibodies for the TNT-dextran conjugate than for TNT in solution.

Table 2 compares the analytical results of the standard ELISAs with the microarray-based ELISA for the detection of the three target molecules. Concerning the sensitivity of the two types of assays, the multiplex immunoassay in a microarray

Table 2 Performances' comparison between standard ELISA and microarray-based ELISA for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2,4,6-trinitro-toluene (TNT) and okadaic acid (OA)^a

	2,4-D		TNT		OA	
	ELISA	Microarray	ELISA	Microarray	ELISA	Microarray
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10	0.01	10 000	100	10	0.02
IC ₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1000	20	100 000	2000	1000	1
Linearity range (from – to)	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$
	1 g L^{-1}	10 mg L^{-1}	1 g L^{-1}	20 mg L^{-1}	10 mg L^{-1}	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
RSD mean (%)	19.7	10.7	13.0	7.5	11.6	9.5

^a LOD: limit of detection; IC₅₀: half maximal inhibitory concentration; RSD: relative standard deviation.

format was surprisingly found to be more sensitive than ELISA, with LODs shifted two decades at least. Moreover, the reproducibility of the tests was improved with mean standard deviation almost divided by two in all cases (8 measurement, 6 replicates, 2 runs). Part of these differences can be explained by the surface chemistry difference between the two immobilization supports (polystyrene for classical ELISA, adhesive for microarray), as already pointed out in a previous study.³¹ Then, the second explanation for these better results in a microarray format can be linked to the fact that in the present test, a competitive format is used whose performances are highly dependent upon the ratio between the immobilised probe and the free target molecule.³⁵ Indeed, in a competitive format, the lowest the amount of the immobilised probe the highest the effect of low concentration of the free target on the detected signal. Thus, comparing the 20 mm² surface of an entire coated well with the 20 μm^2 surface of one spot gives an idea of the difference in the immobilised probe amount between the two systems (at least 1000). This difference obviously directly impacts the assays, contributing to the enhancement of the performances of the microarray *versus* the standard ELISA system. Even if the sensitivity achieved was lower than that previously described by other groups (LOD down to 6–20 ng L⁻¹),^{24–27} it is finally worth mentioning that using the most appropriate support for microarrays enabled the achievement of higher performances than our ELISA system on a microtiter plate and also of previously described immunosensors, except for TNT detection.^{15,19,22,36,37}

Multiplex pollutant sensing

In order to evaluate the performances of our competitive immunoassay in a microarray format for the detection of multiple pollutants, spiked samples were prepared with various concentrations of one or several targets in water. The composition of the samples is given in Table 3 together with the recovery values calculated using the concentrations determined thanks to the corresponding calibration curves.

As can be seen, 92.3% of the concentrations were successfully determined with our assay (green boxes in Table 3). Matching concentrations were defined as significantly close values (*i.e.*, 85% $\leq R \leq 115\%$). Moreover, every spike concentration known to be lower than the LOD of a particular target was considered to be successfully determined when a zero value

Table 3 Recovery values obtained with the multiple analyte detection in a microarray format

Sample #	Composition [pollutant] (mg mL ⁻¹)	Recovery = [calculated]/[real]		
		TNT	2,4-D	OA
1	TNT: 0.5/2,4-D: 0.005/OA: 0	73%	124%	
2	TNT: 0/2,4-D: 0.05/OA: 0		107%	
3	TNT: 0/2,4-D: 0.5/OA: 0		103%	
4	TNT: 0/2,4-D: 0/OA: 0.1			ULQ ^a
5	TNT: 1/2,4-D: 0/OA: 0	90%		
6	TNT: 0/2,4-D: 0.1/OA: 0		126%	
7	TNT: 0.0005/2,4-D: 0/OA: 0.05	LOD		ULQ ^a
8	TNT: 0/2,4-D: 0/OA: 0.005			108%
9	TNT: 0.005/2,4-D: 0/OA: 0	LOD		
10	TNT: 0/2,4-D: 0/OA: 0.0005			115%
11	TNT: 0.05/2,4-D: 0/OA: 0	LOD		
12	TNT: 0/2,4-D: 0.0005/OA: 0.00005		LOD	LOD
13	TNT: 0/2,4-D: 0/OA: 0			
Successfully determined: 92.3%		Significantly different: 7.7%		

^a ULQ: real values are higher than the upper limit of quantification.

was calculated. Besides, 7.7% of the calculated concentrations were found to be significantly different but not incoherent (70% $\leq R < 85\%$ and 115% $< R \leq 130\%$) from the spiking values (orange boxes in Table 3). Thanks to the low cross-reactivity previously observed between the antibodies and the immobilized probes, no false positive was obtained, and for concentrations known in quantification ranges of each target, the calculated concentrations were very close to the ones expected.

Conclusion

In this comparative study, we demonstrated the advantages of an adhesive-based microarray in a 96-well plate format for the multiplex detection of three different types of small molecule pollutants in water.

Assay characteristics and performances of a multiplex immunoassay in a microarray format were proven to exceed the ones obtained from classical ELISA. Indeed, with an important reduction of costs and time of experiment, the multiplex test was shown to be compatible with high-throughput requirement, but also to enhance the detection performances. It will now be necessary to evaluate the performances of the tests with real environmental samples, in order to validate them for this

application. Moreover, further improvements shall be to combine the multiplexing properties of the microarray with an increased number of targets, using the ultrahigh throughput possibilities of 384- or 1536-well plates.³⁸ Indeed, up to 100 spots per well can be obtained in a 384-well format and 25 in a 1536-well format. This is clearly an interesting avenue for future developments of the present water monitoring system.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Milan Franek for the supply of anti-2,4-D antibodies. This work has been supported in part by the European Commission Program STREP-FP7-SEC-2010-1.3-3-BONAS BOmb factory detection by Networks of Advanced Sensors.

Notes and references

- 1 B. S. Levine, E. M. Furedi, D. E. Gordon, J. J. Barkley and P. M. Lish, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1990, **15**, 373–380.
- 2 W. C. Roberts, B. J. Commons, H. T. Bausum, C. O. Abermathy, J. J. Murphy and K. Khanna, *U.S. Environmental Protection Agency 1993*, EPA 822-R-93-022, 1993.
- 3 D. R. Shankaran, T. Kawaguchi, S. J. Kim, K. Matsumoto, K. Toko and N. Miura, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **386**, 1313–1320.
- 4 U.S. EPA, *Determination of chlorinated acids in drinking water by liquid–liquid microextraction, derivatization, and fast gas chromatography with electron capture detection*, Method 515.4, Revision 1.0, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 2000.
- 5 U.S. EPA, *Determination of selected pesticides and flame retardants in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry*, Method 527, Revision 1.0, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO, 2005.
- 6 U.S. EPA, *Technologies and Techniques for Early Warning Systems to Monitor and Evaluate Drinking Water Quality: State-of-the-Art Review*, U.S. Environmental Protection Agency, 2005.
- 7 S. Singh, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **144**, 15–28.
- 8 M. S. Meaney and V. L. McGuffin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **391**, 2557–2576.
- 9 H. Li, J. X. Wang, Z. L. Pan, L. Y. Cui, L. A. Xu, R. M. Wang, Y. L. Song and L. Jiang, *J. Mater. Chem.*, 2010, **21**, 1730–1735.
- 10 W. Chen, Y. Wang, C. Bruckner, C. M. Li and Y. Lei, *Sens. Actuators, B*, 2010, **147**, 191–197.
- 11 Y. M. Shlyapnikov, E. A. Shlyapnikova, M. A. Simonova, A. O. Shepelyakovskaya, F. A. Brovko, R. L. Komaleva, E. V. Grishin and V. N. Morozov, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 5596–5603.
- 12 S. Morais, L. A. Tortajada-Genaro, T. Arnandis-Chover, R. Puchades and A. Maquieira, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 5646–5654.
- 13 E. Mallat, D. Barcelo, C. Barzen, G. Gauglitz and R. Abuknesha, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2001, **20**, 124–132.
- 14 S. Girotti, E. Ferri, E. Maiolini, L. Bolelli, M. D'Elia, D. Coppe and F. S. Romolo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 313–320.
- 15 G. P. Anderson, S. C. Moreira, P. T. Charles, I. L. Medintz, E. R. Goldman, M. Zeinali and C. R. Taitt, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2279–2285.
- 16 S. Bhand, I. Surugiu, A. Dzgoev, K. Ramanathan, P. V. Sundaram and B. Danielsson, *Talanta*, 2005, **65**, 331.
- 17 J. Kaur, R. C. Boro, N. Wangoo, K. R. Singh and C. R. Suri, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **607**, 92–99.
- 18 Y. Wang, N. Liu, B. A. Ning, M. Liu, Z. Lv, Z. Y. Sun, Y. Peng, C. C. Chen, J. W. Li and Z. X. Gao, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **34**, 44–50.
- 19 M. G. Weller, A. J. Schuetz, M. Winklmaier and R. Niessner, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **393**, 29–41.
- 20 C. A. Marquette, B. P. Corgier and L. J. Blum, *Bioanalysis*, 2012, **4**, 927–936.
- 21 B. P. Corgier, C. A. Mandon, G. C. Le Goff, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Lab Chip*, 2011, **11**, 3006–3010.
- 22 M. Franek, V. Kolar, M. Granatova and Z. Nevorankova, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 1369–1374.
- 23 C. Desmet, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 10267–10276.
- 24 A. Sassolas, G. Catanante, A. Hayat, L. D. Stewart, C. T. Elliott and J. L. Marty, *Food Control*, 2013, **30**, 144–149.
- 25 G. Matuszczyk, D. Knopp and R. Niessner, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 41–47.
- 26 C. Keuchel, L. Weil and R. Niessner, *Anal. Sci.*, 1992, **8**, 9–12.
- 27 C. Desmet, G. C. Le Goff, J. C. Bres, D. Rigal, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Analyst*, 2011, **136**, 2918–2924.
- 28 U.S. EPA, in *US national primary drinking water regulations 40CFR141*, US Environmental Protection Agency, 1999.
- 29 E. U. Council, in *Official Journal of the European Communities*, 1998, pp. 32–54.
- 30 U.S. EPA, in *Standards Division Office of Drinking Water Report*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1988.
- 31 G. C. Le Goff, B. P. Corgier, C. A. Mandon, G. De Crozals, C. Chaix, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Biosens. Bioelectron.*, 2012, **35**, 94–100.
- 32 W. Luo, M. Pla-Roca and D. Juncker, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 5767–5774.
- 33 G. Jones, M. Wortberg, B. D. Hammock and D. M. Rocke, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **336**, 175–183.
- 34 M. Pla-Roca, R. F. Leulmi, S. Tourekhanova, S. Bergeron, V. Laforte, E. Moreau, S. J. C. Gosline, N. Bertos, M. Hallett, M. Park and D. Juncker, *Mol. Cell. Proteomics*, 2012, **11**, DOI: 10.1074/mcp.M111.011460.
- 35 S. S. Deshpande, *Enzyme Immunoassays*, Chapman & Hall, ITP, New York, 1996.
- 36 S. Girotti, S. Eremin, A. Montoya, M. J. Moreno, P. Caputo, M. D'Elia, L. Ripani, F. S. Romolo and E. Maiolini, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 687–695.
- 37 S. Y. Rabbany, W. J. Lane, W. A. Marganski, A. W. Kusterbeck and F. S. Ligler, *J. Immunol. Methods*, 2000, **246**, 69–77.
- 38 C. A. Mandon, O. I. Berthuy, B. P. Corgier, G. C. Le Goff, P. Faure, P. N. Marche, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **39**, 37–43.

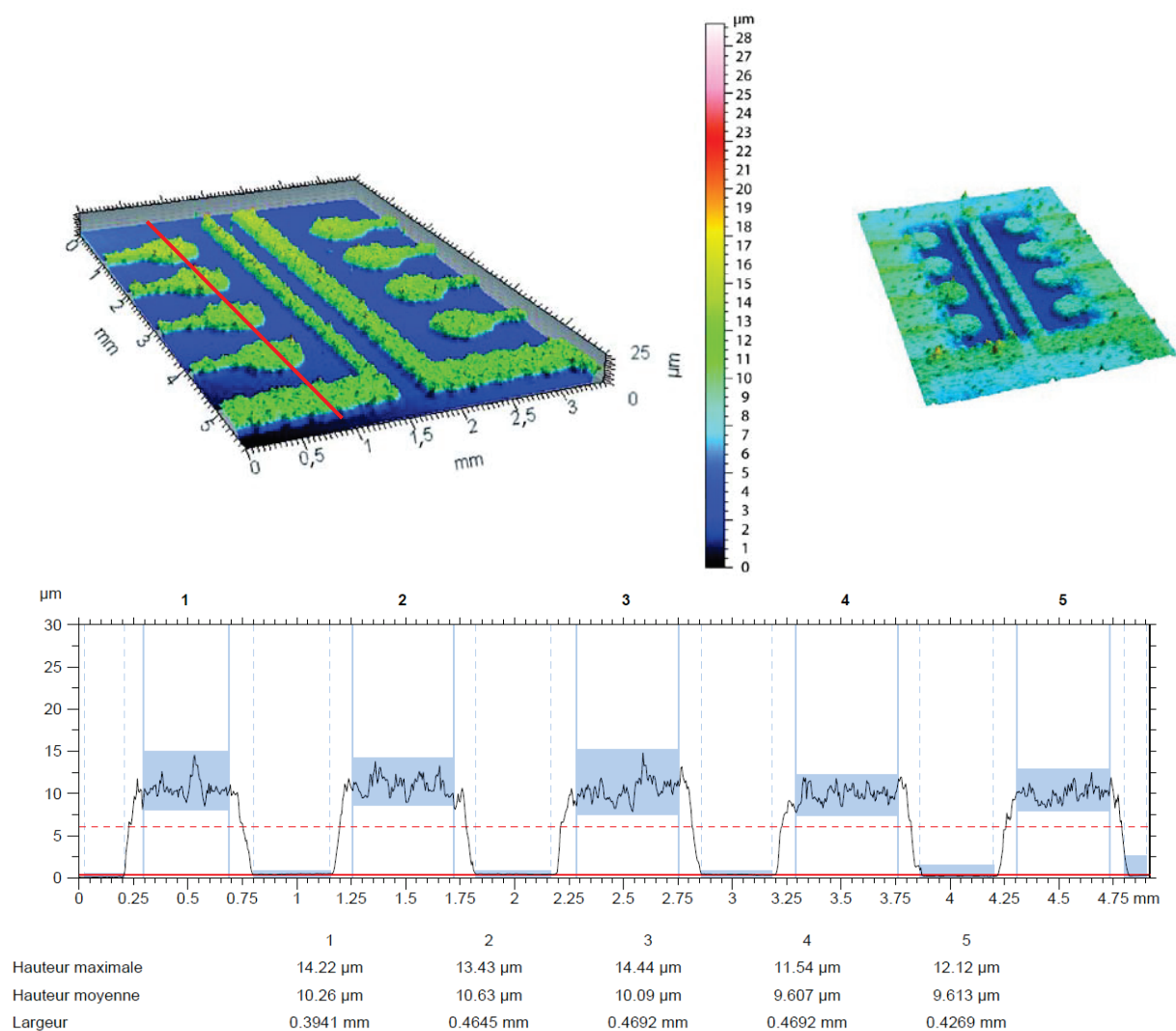
3. APPLICATION 2 : LE CONTROLE DE L'UTILISATION DE PRECURSEURS DE SYNTHÈSE D'EXPLOSIFS

Dans le cadre du projet européen BONAS, un second outil d'analyse a été développé. L'objectif de celui-ci concerne non plus la détection de molécules d'explosifs mais de leurs précurseurs de synthèse. Pour cela, la détection par méthode immunologique n'est plus envisageable étant donné que les molécules en question sont des molécules de très faible poids moléculaire, n'induisant pas de réponse immunitaire. Une méthode électrochimique de mesure a donc été utilisée ici. Des signatures électrochimiques correspondant aux différentes cibles seront définies à partir de mesures de voltammétrie cyclique effectuées sur des électrodes présentant différentes propriétés. Lors de l'analyse d'un échantillon test, ces signatures permettront de déterminer la composition initiale en précurseurs. Les cibles ont été sélectionnées en accord avec les priorités établies dans le cadre du projet européen : le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite de sodium, le nitrate d'ammonium et l'hexamine sont les quatre précurseurs à identifier lors de cette analyse (la quantification de ces cibles ne faisant pas partie des objectifs du projet).

3.1. ETUDE PRELIMINAIRE

3.1.1. FABRICATION DU RESEAU D'ELECTRODES

Les électrodes utilisées dans cette étude sont fabriquées par sérigraphie d'encre de carbone afin de former le réseau conducteur, et de vernis isolant pour délimiter les zones de travail et de connexion. Les conditions utilisées pour le processus de sérigraphie ont été choisies de façon à produire de manière reproductible des électrodes constituées d'une couche régulière de carbone permettant le passage des électrons. Ces électrodes ont été caractérisées par profilométrie à capteur confocal. Les images obtenues (Figure 6-2) permettent de vérifier que la couche de carbone est continue et assez homogène, bien que rugueuse, d'une épaisseur de 10 μm (+/- 0,4) (Figure 6-2 A. et C.). La couche de vernis (Figure 6-2 B.), encore plus rugueuse, délimite bien la zone de travail constituée des 8 électrodes de travail, de la contre-électrode et de l'électrode de référence.



3.1.2. MODIFICATION DE SURFACE DES ELECTRODES DE TRAVAIL PAR ELECTRODEPOT DE METAUX

Les électrodes sérigraphiées ont été modifiées par électrodépôt de plusieurs métaux, afin de générer des surfaces de mesure aux propriétés différentes qui permettront d'améliorer la sélectivité des signatures. En effet, les signatures étant composées des voltamogrammes obtenus par mesure électrochimique sur chacune des surfaces, elles comprendront plus d'informations permettant ainsi de différencier les composés cibles. Les conditions de dépôt ont été contrôlées et optimisées, afin d'obtenir des surfaces métallisées de façon homogène. Le dépôt étant effectué par chronopotentiométrie galvanostatique, l'intensité du courant appliqué est modulable, ainsi que la durée d'application. Les dépôts obtenus dans différentes conditions de courant appliqué sont observés par microscopie optique à l'aide de la technique de Nomarski, particulièrement adaptée à l'observation des surfaces. La Figure 6-3 présente

des dépôts d'or obtenus après chronopotentiométrie en présence de différents courants appliqués. Les différences de couverture de la surface par le dépôt d'or résultent des conditions utilisées. Pour $-15\ \mu\text{A}$ de courant appliqué pendant 10 minutes, des agrégats de particules isolés sont formés à la surface. En augmentant la durée à 20 minutes, une quantité plus importante de particules est observée, cependant certaines zones de l'électrode ne sont pas recouvertes. C'est en modifiant le courant à $-30\ \mu\text{A}$ pour une durée de 10 minutes que le dépôt le plus homogène est obtenu. Dans ces conditions, l'électrode est entièrement recouverte d'un dépôt métallique. Ces observations ont conduit au choix des conditions du dépôt pour chaque métal. Le Palladium et le Platine ont été électrodéposés en appliquant un courant de $-15\ \mu\text{A}$ pendant 10 minutes. Les solutions de métaux HAuCl_4 , $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ et H_2PtCl_6 à des concentrations de 10 mM ont été utilisées en présence de HCl 0,1 M. Afin que l'électrode de carbone nue ait subi un traitement équivalent aux autres électrodes, un courant de $-15\ \mu\text{A}$ lui a également été appliqué pendant 10 minutes en présence d'une solution d' HCl 0,1 M.

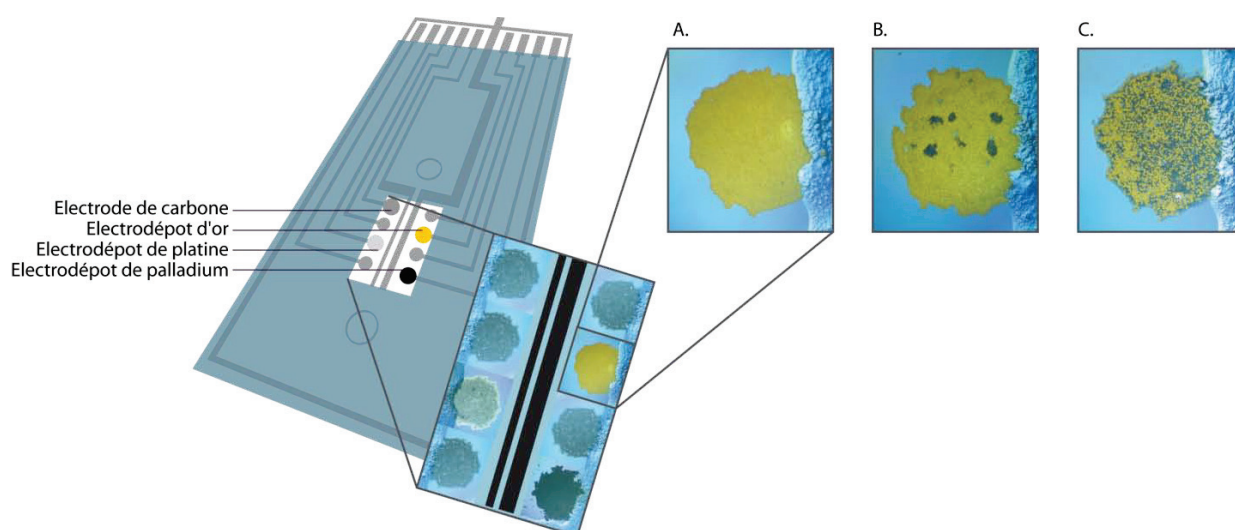


Figure 6-3. Images des électrodes de travail observées en microscopie optique
Chronopotentiométrie galvanostatique pour l'électrodépôt d'or avec application de A. $-30\ \mu\text{A}$ pendant 10 min, B. application de $-15\ \mu\text{A}$ pendant 20 min, C. application de $-15\ \mu\text{A}$ pendant 10 min.

Les électrodes ainsi modifiées ont été ensuite caractérisées par microscopie électronique à balayage couplée à une analyse élémentaire par énergie dispersive de rayons X (EDX) avec un tilt de 45° , une tension d'accélération de 15 kV et un temps de comptage moyen de 45 secondes. Les résultats de ces analyses sont présentés sur la Figure 6-4.

Les images obtenues démontrent la présence de particules de métaux de 400 nm environ, recouvrant l'ensemble de l'électrode de travail concernée. L'analyse élémentaire valide la présence du métal sur l'électrode, avec une couverture telle que le carbone n'apparaît quasiment plus sur les surfaces modifiées.

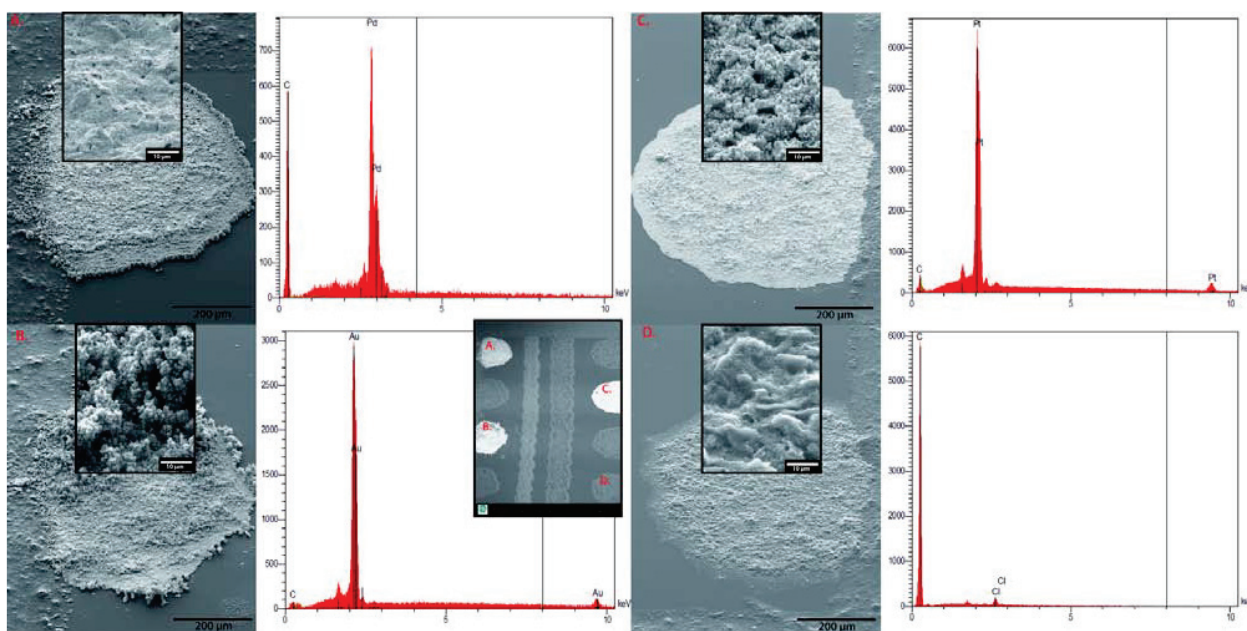


Figure 6-4. Images des électrodes observées par microscopie électronique à balayage, couplée à une analyse élémentaire
A. Electrode avec dépôt de palladium, B. avec dépôt d'or, C. avec dépôt de platine, D. électrode de carbone nu.

Ces études de caractérisation préliminaires ont permis de valider les étapes de préparation des surfaces de travail, permettant le développement du capteur électrochimique décrit au paragraphe suivant.

3.2. DEVELOPPEMENT D'UN CAPTEUR ELECTROCHIMIQUE POUR LA DETECTION DE PRECURSEURS D'EXPLOSIFS

Les résultats obtenus lors de cette étude sont décrits dans l'article suivant.

❖ Article 5. ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR EXPLOSIVES PRECURSORS DETECTION IN WATER

Cloé Desmet, Loïc J. Blum, Christophe A. Marquette

En préparation.

Le capteur électrochimique développé pour cette étude est basé sur un réseau d'électrodes fabriqué par sérigraphie, dont les électrodes de travail ont été modifiées par différents dépôts de particules métalliques. Ces puces, dédiées à la détection de précurseurs de synthèse d'explosifs, combinent les avantages d'être peu coûteuses, jetables, simples d'utilisation et de taille très réduite donc facilement transportables. Un système a de plus été fabriqué afin que ce capteur puisse être utilisé pour des analyses sur site, une condition requise dans le cadre du projet européen.

Des mesures de voltammétrie cyclique ont été réalisées simultanément sur les quatre électrodes de travail différentes, en présence des précurseurs cibles en solution, seuls ou mélangés, à des concentrations de 100 mM. Les signaux obtenus sont composés de quatre voltamogrammes, chacun correspondant à l'une des surfaces. Des signatures ont alors été définies, associées à chaque composé et à la composition de chaque mélange de composés. La discrimination entre deux composés peut être réalisée à partir de l'un des voltamogrammes au moins, correspondant à une surface sur laquelle le signal diffère de celui des autres composés. Une base de données de signatures a alors été construite, comprenant toutes les combinaisons de composés. Un traitement statistique est ensuite exécuté de façon à déterminer la composition des échantillons par comparaison à la base de données.

De façon pratique, l'analyse de l'eau est effectuée à proximité d'une zone suspecte en utilisant le système fabriqué dans ce but. Celui-ci consiste en un assemblage de la puce avec une paroi de plastique, réalisé à l'aide d'un adhésif double face servant d'espaceur, créant une chambre pouvant contenir 35 μL de liquide. Un connecteur multi-voie, fixé à une extrémité d'un raccord de tuyau amovible, permet la connexion du réseau d'électrode à un potentiostat portable situé à l'extérieur du tuyau. En présence d'eau, la chambre se remplit par capillarité d'un volume constant de liquide et la mesure peut débuter (Figure 4-11, page 145). Les quatre voltamogrammes obtenus sont alors comparés à la base de données de signatures, afin de déterminer la composition en précurseur. Pour cette étape, et afin de démontrer la sélectivité du système et la nécessité d'utiliser les différentes surfaces pour la discrimination des composés, une analyse en composante principale est exécutée. Pour cela, les intensités mesurées sont normalisées en fonction du signal maximal obtenu sur chacune des surfaces. L'analyse statistique est ensuite réalisée en collaboration avec Adriana Puiu (ENEA, Italie). Cette partie de traitement des données est en cours d'optimisation, les résultats ne sont donc pas présentés en détail dans cette thèse.

Des études complémentaires devront par la suite être effectuées, afin de déterminer de façon plus précise la sélectivité et la sensibilité de l'outil. Dans ce contexte, les composés listés dans les directives du Parlement Européen et du Conseil du 15 janvier 2013 concernant la commercialisation et l'utilisation de précurseurs d'explosifs devront être testés, ainsi que l'ensemble des interférents et milieux de mesure potentiels. Enfin, des gammes de concentration seront réalisées afin de calculer les limites de détection des différents composés.

ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR EXPLOSIVES PRECURSORS DETECTION IN WATER

C. Desmet^{1*}, L. J. Blum¹, C. A. Marquette^{1,2}

¹*Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1 -CNRS 5246, Villeurbanne, France.*

²*Axoscience, Lyon, France.*

* Corresponding author email: cloe.desmet@etu.univ-lyon1.fr

Although all countries are intensifying their efforts against terrorism and increasing their mutual cooperation, terrorist bombing is still one of the greatest threats to society. The discovery of hidden bomb factories is of primary importance in the prevention of terrorism activities. Explosives precursors presence in waste water, coming from improvised explosive device preparation, is an important clue for bomb factories localization. Nevertheless, there is currently no specific sensor available to survey the presence of precursors in the waste water of a suspected location.

We are reporting here a new multiplex electrochemical sensor dedicated to the on-site simultaneous detection of four explosive precursors, potentially used for improvised explosive device preparation: hexamine, hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium hypochlorite (NaOCl) and ammonium nitrate (NH_4NO_3). The electrochemical chips were designed to be disposable and to combine ease of use and portability thanks to a simple and inexpensive carbon paste screen-printing fabrication technique. The chips were composed of one counter electrode, one pseudo-reference electrode and eight working electrodes which were modified with different electrodeposited metals: gold, palladium and platinum. These different coatings are giving its selectivity to the multi-sensor through a “fingerprint” like signal of the multiplex detection.

In order to carry out “on-pipe” measurements, a complete device was designed, enabling to assemble the electrochemical chip with the pipe and to easily start the measurement. This assembly creates a device which fills up and autonomously triggers the electrochemical measurement in presence of wastewater. The four different electrode surfaces (carbon, gold, platinum and palladium) enabled to obtain four different electrochemical signatures which were compared with previously obtained data for each compound. Our sensor was proven to be able to detect and to differentiate the four explosive precursors, alone or mixed together, with good accuracy and selectivity.

INTRODUCTION

Although all countries are intensifying their efforts against terrorism and increasing their mutual cooperation, terrorist bombing is still one of the greatest threats to society. The discovery of hidden bomb factories is of primary importance in the prevention of terrorism activities. Different explosives have been widely used in improvised explosive devices (IEDs) by terrorists, due to their relatively simple preparation and readily available precursors. For instance, triacetone triperoxide (TATP) (prepared with acetone, hydrogen peroxide and a strong acid), cyclotrimethylenetrinitramine (RDX) (prepared with hexamine and nitric acid), hexamethylene triperoxide diamine (HMTD) (prepared with hydrogen peroxide, hexamine and citric acid), trinitrotoluene (TNT) (prepared with toluene and nitric acid) can be synthesized with commercially available chemicals. Other reagents such as sodium hypochlorite or ammonium nitrate are known to being used for explosive preparation in different bombing events. Consequently, growing security concerns have generated urgent needs for innovative tools for on-field screening of homemade explosives and their precursors. In numerous security applications, the reliable multiparametric detection of these precursors using a small portable and disposable sensor is required.

During the last few years, an important increase of research within this area has been observed, through development of new detection approaches and improvements of existing techniques. Spectroscopic approaches have been the most widely explored [1-6], but quartz crystal microbalance (QCM), ion chromatography [7],

capillary electrophoresis [8], nanotechnology based-methods (using molecularly imprinted polymers [9], nanotubes, or nanoparticles) and sensor techniques [10-14] have also been largely described. Amongst the different type of sensors developed to address this need, the electrochemical sensors [15-17] present the advantages to be very fast, inexpensive and a viable option of miniaturization. Nevertheless, the already described devices rarely enabled a multiparametric detection. We are reporting here a new multiplex electrochemical sensor dedicated to the on-site simultaneous detection of four explosive precursors, potentially used for improvised explosive device preparation: hexamine, hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium hypochlorite (NaOCl) and ammonium nitrate (NH_4NO_3). The electrochemical chips were designed to be disposable and to combine ease of use and portability thanks to a simple and inexpensive screen-printing fabrication technique.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents

Chloroplatinic acid hexahydrate (H_2PtCl_6), gold (III) chloride (HAuCl_4), palladium acetate ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), hexamethylenetetramine (hexamine), sodium hypochlorite (NaOCl) and ammonium nitrate (NH_4NO_3) were purchased from Sigma (Lyon, France). Hydrogen peroxide (H_2O_2), sodium chloride (NaCl) and hydrochloric acid (HCl) were obtained from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France).

All solutions were prepared with ultrapure water (18.2 M Ω).

Procedures

Screen-Printed Carbon Electrodes Preparation

A DEK 248 screen-printing machine (Dek International, France) was used to produce the electrode microarrays onto Lexan 80330 colorless polycarbonate sheets (A5 format, 21 cm x 14.8 cm, 1 mm thick) (ThyssenKrupp Cadillac Plastic, France) as previously described [18]. A polyester monofilament fiber screen Dek 305 (120/31) characterized by a mesh size of 260 counts/in and a thickness of 13 μm was used to print the carbon ink (Electrodag® 423 SS; Acheson). After printing, the polyester sheets supporting 16 electrode microarrays were baked 10 min at 100°C to cure the thermoplastic carbon ink. A second layer, composed of insulating polymer (Minico® M 7000 Blue; Acheson) was then printed on the electrode networks to define a window delimiting the active area composed of eight 600 μm diameter individually addressable working electrodes, one pseudo-reference electrode, and one auxiliary electrode (Figure 1.a.). This was followed by a last baking step of 10 min at 100°C.

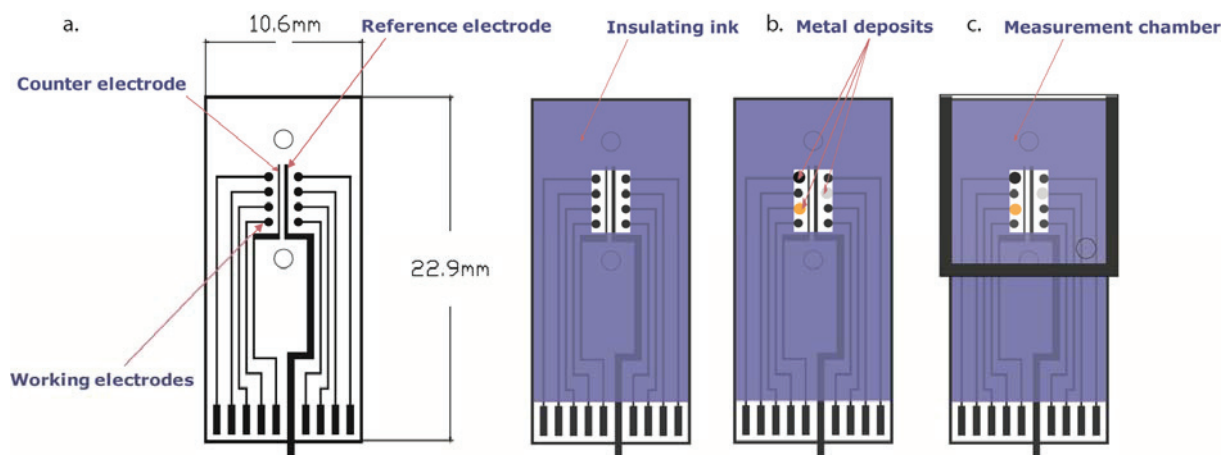


Figure 1. Electrode preparation. a. screen-printing design, b. working electrodes modification by palladium, gold and platinum electrodeposition, c. chip assembly.

Working Electrodes modification

Four of the eight working electrodes were modified in order to generate different surfaces for electrochemical measurement (Figure 1.b.). Three metals were independently electrodeposited through galvanostatic

chronopotentiometry as previously described [19], in which a constant current was applied during 10 minutes, leading to a fixed charge, optimized for each type of metal solution. In practice, a drop of 40 μL of the solution was deposited on the active area prior chronopotentiometry. The gold deposition was carried out using a fixed current of $-30\text{ }\mu\text{A}$, in the presence of a solution of 10 mM HAuCl_4 in 0.1 M HCl . A fixed current of $-15\text{ }\mu\text{A}$ was applied for the palladium and platinum deposition in the presence of a solution composed of 10 mM or $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ or H_2PtCl_6 in 0.1 M HCl . Finally, a fixed current of $-15\text{ }\mu\text{A}$ was applied to a bare carbon working electrode in a solution of 0.1 M HCl . Following each deposition, the screen-printed microarrays were rinsed with ultrapure water.

Chip assembly

Once the working electrodes modified, a measuring chamber was created thanks to the assembly of the electrode microarray with a 15x15 mm plastic window, using a double-side adhesive (3M, France) cut into a U-shape with a SilhouetteTMSD (QuickCutz) apparatus. This assembly (Figure 1.c.) created a delimited chamber which filled up automatically with a constant volume of 35 μL using capillary forces.

In order to carry out “on-pipe” measurements, a complete device was designed, enabling to assemble the electrochemical chip with the pipe and to easily start the measurement.

Electrochemical Measurement

Cyclic voltammetry measurements were achieved simultaneously on the four electrodes. The potential range used was +1.0 to -1.0 V for the gold-modified working electrode and the -1.0 to +0.5 V for the palladium-, platinum- and non-modified working electrodes using a computer-controlled Multi-potentiostat VMP3 workstation (Bio-Logic, France). The measurements were realized in NaCl 0.1 M electrolyte solution, containing either one target precursor at a concentration of 100 mM, or a mixture of several target precursors.

Voltammogram analysis

In order to identify a compound with the electrode microarray, the signal obtained from a sample was compared with pre-determined signatures. These signatures were defined as the signal obtained by cyclic voltammetry with the compound and are characterized by 4 different curves corresponding to the different measurement surfaces.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrochemical sensors combined with cyclic voltammetry methods, enable to generate a specific signal, function of the sample in the presence of which the measurement is realized, but also of the electrode surface. Indeed, numerous chemicals have a specific signal, which may vary with the electrode composition. Nevertheless, the differentiation between two chemicals is hardly possible with only one voltammogram, and a signature of several voltammograms obtained on different surfaces, used like a compound “fingerprint” may drastically increase the result specificity. In the present study, an electrochemical chip has been developed with the objective of being able to discriminate between different chemicals, through cyclic voltammetry measurements and thus provide a multiplex electrochemical detection.

Electrodeposition

Modifying the electrode network in an addressed manner was in the present study a key parameter to generate different measurement surfaces. The electrodeposition of each metal was then controlled and optimized in order to obtain a homogenous coverage of the working electrodes (figure 2). Each deposition process was validated by analyzing the $I=f(t)$ curves, but also thanks to microscopic observations.

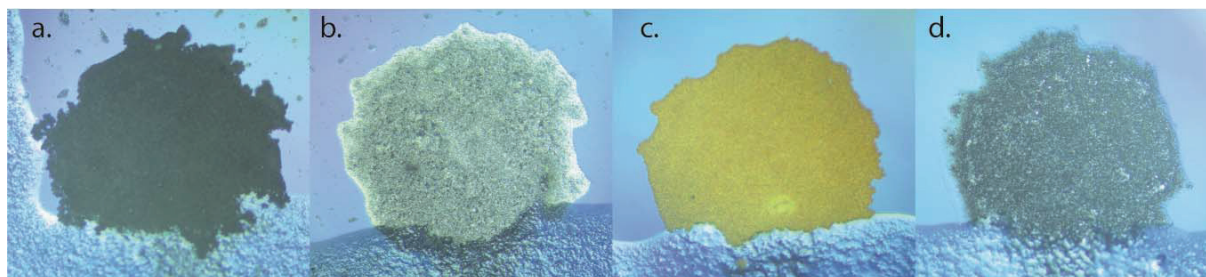


Figure 2. Working electrodes with a. palladium deposit, b. platinum deposit, c. gold deposit, d. bare carbon.

The cyclic voltammetry signals obtained in pure electrolyte on the different surfaces gave the baseline for comparison with the target compounds. As can be seen in figure 3, the four surfaces already enabled to distinguish different signals, and a “no-target fingerprint” was defined thanks to the curves associated to the different surfaces.

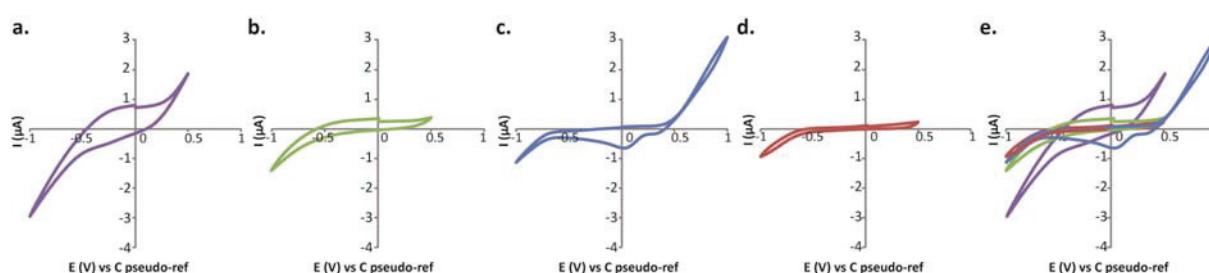


Figure 3. Voltammograms in the presence of NaCl 0.1 M on different working electrode surfaces: a. palladium, b. platinum, c. gold, d. carbon, e. buffer fingerprint.

Signature definition

A first row of experiments was performed in order to define a signature for each compound. The cyclic voltammetry measurements were realized simultaneously on the four modified working electrodes, leading to a four-curve multi-voltammogram (figure 4). For buffer only and for each compound, the measurements were performed as 3 cycles on 12 chips. The voltammograms were then analyzed and the mean signal obtained on each of the surfaces used to determine a compound-specific signature (figure 4).

As can be seen in figure 4, each surface was useful for identification of the target molecules. Indeed, the palladium surface for example (figure 4.a.) exhibited relatively close signals for the tested chemicals, nevertheless, NH_4NO_3 presented a specific peak at a potential of -0.7 V which was not observed for the 3 other compounds. This surface enabled to recognize NH_4NO_3 but did not give information discriminating the other chemicals. The platinum surface (figure 4.b.) also showed similar voltammograms for the different targets. H_2O_2 presented however a peak slightly different from the other chemicals at a potential of -0.1 V and it has to be considered as a clue for the determination of the analyzed sample. The gold surface (figure 4.c.) enabled to obtain a peak for a potential of -0.5 V, specific of NaOCl . Moreover, hexamine was the only chemical which did not exhibit the peak present for a potential of 0 V in the presence of H_2O_2 and NH_4NO_3 . Finally, the carbon working electrode (figure 4.d.) could confirm the previous suppositions thanks to the analysis of the curve for a -1 V potential, where different shapes were observed for the different targets. Figure 4.e. presents the overlapped four cyclic voltammograms for each compound, called “fingerprint”. These fingerprints enabled the identification of each of the four compounds, using simple electrochemical measurements.

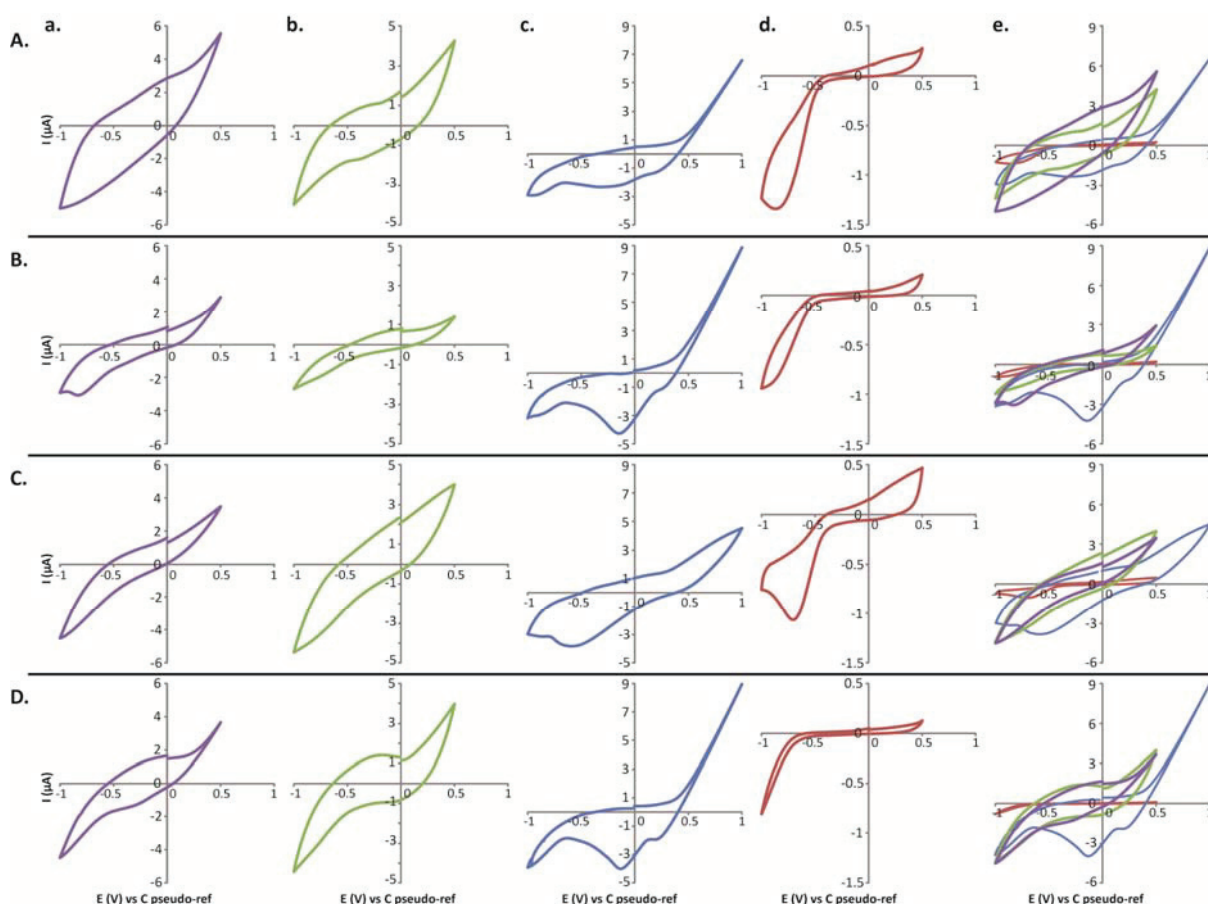


Figure 4. Voltammograms of A. Hexamine B. NH_4NO_3 C. NaOCl D. H_2O_2 on the different working electrode surfaces a. palladium b. platinum c. gold d. carbon e. compound fingerprint

Precursors detection

In a similar way, mixtures of the different precursors were tested and the corresponding voltammograms used to build up a database (data not shown) which enabled to discriminate between a single- and a multi-compounds signal. Here, the comparison of fingerprint with both the isolate compound signatures and the buffer signature was used.

Once the target chemicals signatures defined, spiked samples were prepared with the different compounds alone or mixed together, and cyclic voltammetry measurements were realized. The four-curves voltammograms obtained were compared with the pre-defined fingerprint, following a signal analysis process. This process enabled to determine the composition of most of the samples, thanks to the specificity of the four-curve signals.

CONCLUSION

In this proof of concept study, we demonstrated the applicability of a modified screen-printed electrode microarray for the multiparametric on-site detection of four different types of explosive precursors in water. Thanks to four different measurement surfaces, complex data were generated and used to define molecule electrochemical fingerprints. The precise comparison of these 4 voltammograms with pre-defined fingerprints enables the identification of each compound.

Our device enabled to discriminate between different target chemicals which are important clues for bomb factories localization because of their use in improvised explosive devices preparation. Coupling this selectivity, with portability, ease of use and low cost of the screen printed electrodes, makes this new electrochemical route extremely attractive for addressing a wide range of on-field threat detection.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has been supported by the European Commission Program STREP-FP7-SEC-2010-1-Bomb Factory Detection by Networks of Advanced Sensors.

REFERENCES

1. J.D. King and A. De los Santos, *Applied Magnetic Resonance* **25**(3-4) 535-565 (2004).
2. J. Barras, M.J. Gaskell, N. Hunt, R.I. Jenkinson, K. Mann, D. Peddar, G.N. Shilstone, and J.A.S. Smith, *Detection of ammonium nitrate inside vehicles by Nuclear Quadrupole Resonance*. Detection of Bulk Explosives: Advanced Techniques against Terrorism, ed. H. Schubert and A. Kuznetsov. Vol. 138. 2004, Dordrecht: Springer. 125-125.
3. J. Moros, J.A. Lorenzo, P. Lucena, L.M. Tobaría, and J.J. Laserna, *Analytical Chemistry* **82**(4) 1389-1400 (2010).
4. M.L. Ramirez, H. Felix-Rivera, R. Sanchez-Cuprill, and S.P. Hernandez-Rivera, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **102**(2) 549-555 (2010).
5. S.S. Cheng, J. Dou, W.G. Wang, C. Chen, L. Hua, Q.H. Zhou, K.Y. Hou, J.H. Li, and H.Y. Li, *Analytical Chemistry* **85**(1) 319-326 (2013).
6. H. Ostmark, M. Nordberg, and T.E. Carlsson, *Applied Optics* **50**(28) 5592-5599 (2011).
7. C. Johns, R.A. Shellie, O.G. Potter, J.W. O'Reilly, J.P. Hutchinson, R.M. Guijt, M.C. Breadmore, E.F. Hilder, G.W. Dicinoski, and P.R. Haddad, *Journal of Chromatography A* **1182**(2) 205-214 (2008).
8. K.G. Hopper, H. LeClair, and B.R. McCord, *Talanta* **67**(2) 304-312 (2005).
9. D.C. Apodaca, R.B. Pernites, F.R. Del Mundo, and R.C. Advincula, *Langmuir* **27**(11) 6768-6779 (2011).
10. J. Wang, *Analytica Chimica Acta* **507**(1) 3-10 (2004).
11. S. Singh, *Journal of Hazardous Materials* **144**(1-2) 15-28 (2007).
12. J.P. Liu, Y.Y. Li, X.T. Huang, and Z.H. Zhu, *Nanoscale Research Letters* **5**(7) 1177-1181 (2010).
13. A. Bromberg and R.A. Mathies, *Analytical Chemistry* **75**(5) 1188-1195 (2003).
14. P.T. Charles, A.A. Adams, P.B. Howell, S.A. Trammell, J.R. Deschamps, and A.W. Kusterbeck, *Sensors* **10**(1) 876-889 (2010).
15. J. Wang, *Electroanalysis* **19**(4) 415-423 (2007).
16. W. Chen, S. Cai, Q.Q. Ren, W. Wen, and Y.D. Zhao, *Analyst* **137**(1) 49-58 (2012).
17. Q.Y. Yang, Y. Liang, T.S. Zhou, G.Y. Shi, and L.T. Jin, *Electrochemistry Communications* **10**(8) 1176-1179 (2008).
18. C.A. Marquette, F. Bouteille, B.P. Corgier, A. Degiuli, and L.J. Blum, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**(4) 1191-1198 (2009).
19. B.P. Corgier, F. Li, L.J. Blum, and C.A. Marquette, *Langmuir* **23**(16) 8619-8623 (2007).

4. ETUDES COMPLEMENTAIRES : IMMUNOCAPTEUR A SIGNAL ELECTROCHIMIQUE

Les puces à détection électrochimique tout comme les immunotests s'étant révélés être des outils d'analyse multiparamétrique efficace, nous avons décidé d'exploiter l'expérience acquise avec la mise au point des deux types de test présentés précédemment, et d'utiliser les différents blocs les composant pour le développement d'un nouveau capteur. Pour cela, nous avons alors décidé d'associer la méthode de reconnaissance par des anticorps (immunoessai) avec le système de mesure par électrochimie, mais également de tirer partie de la mise en commun d'un support de type membranaire et des conjugués sur billes de latex pour créer un système de flux latéral pour la migration des réactifs de faible poids moléculaire, en conservant les conjugués à une position définie grâce à la taille importante des billes. Nous avons également envisagé l'utilisation des mêmes anticorps secondaires que pour les immunoessais précédents, marqués par la phosphatase alcaline. Il s'avère en effet que la présence de cette enzyme permet d'induire un signal spécifique en électrochimie, grâce à la catalyse de la transformation de certains substrats en des produits électroactifs. Ces différents blocs ont alors été rassemblés, et ont fait l'objet d'une première étude pour une application à la détection de polluants, la mise au point étant réalisée avec le conjugué latex-2,4-D.

4.1. PRINCIPE

Dans cette seconde configuration, l'objectif sera de réaliser l'immunoessai jusqu'à l'étape de déplacement, puis d'analyser électrochimiquement l'échantillon obtenu suite à l'étape finale de déplacement des anticorps par les cibles. Pour cela, l'immunoessai sera réalisé dans un système indépendant, puis transféré en fin de réaction à un système électrochimique pour la mesure. Des anticorps secondaires marqués par la phosphatase alcaline seront utilisés pour l'immunoessai. Ils permettront après déplacement d'obtenir un signal électrochimique grâce à la catalyse de la transformation d'un substrat en un produit électrochimiquement actif.

De façon à développer un outil simple à utiliser, un support innovant a été imaginé, permettant d'intégrer le substrat, d'absorber l'échantillon à analyser, et de réaliser la mesure. Cet outil consiste en une électrode de papier, fabriquée par sérigraphie. Un substrat de la phosphatase alcaline a été déposé au centre de cette électrode, loin des électrodes de mesure. Après la réalisation de l'immunoessai, le produit de déplacement (contenant donc les anticorps marqués) sera déposé sur l'électrode et l'enzyme couplée aux anticorps permettra la catalyse du substrat en un produit électrochimiquement actif. Le flux de solution déposée déplacera le produit vers les électrodes, et le signal obtenu sera fonction de la quantité de produit présent et donc de la concentration en anticorps déplacés, liée elle-même à la concentration des petites molécules à détecter.

Deux parties bien distinctes sont donc développées ci-après, la première concernant l'immunoessai, et la seconde décrivant l'outil d'analyse du produit de déplacement, par électrochimie.

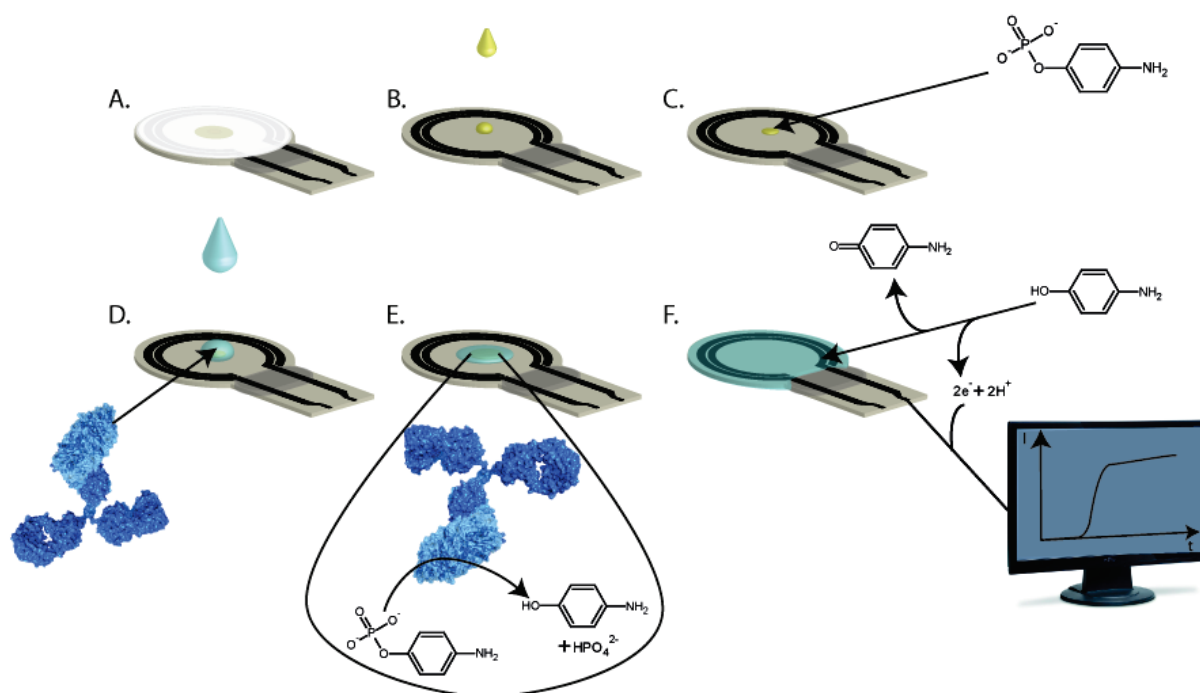


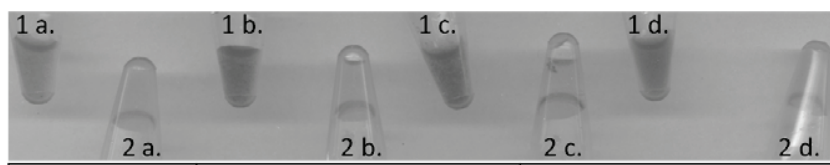
Figure 6-5. Principe de fonctionnement de l'électrode sur papier pour la détection électrochimique de polluant catalysée par une enzyme après immunoessai en suspension

Les différentes étapes d'utilisation sont présentées ici. A. Electrode sérigraphiée de papier comportant une zone de barrière au solvant (de PDMS) et un adhésif de protection de l'électrode (les étapes suivantes sont représentées sans l'adhésif de protection pour une meilleure visualisation du mécanisme ayant lieu dans la partie papier de l'électrode), B. dépôt du substrat de la phosphatase alcaline (p-aminophényl phosphate), C. substrat sec au centre de l'électrode, D. ajout d'un échantillon contenant des anticorps marqués par la phosphatase alcaline, E. catalyse de la réaction enzymatique formant un produit électroactif à partir du substrat sec, F. mesure électrochimique et analyse des résultats.

4.2. REALISATION DE L'IMMUNOESSAI EN TUBE

Sur le même principe que les immunoessais multiparamétriques déjà décrits dans les chapitres précédents de cette thèse, un nouveau système a été testé. Celui-ci consiste en un essai réalisé en tube eppendorf, dans lequel les sondes sont des conjugués sur latex, les incubations sont réalisées de manière classique, et les lavages sont effectués par centrifugation/élimination du surnageant. Ce système a été éprouvé dans un premier temps en utilisant une détection colorimétrique.

Le signal non-spécifique a été mesuré, en parallèle du signal spécifique pour différentes concentrations d'anticorps, ainsi que les variations de signal lors du déplacement. Les résultats de ces mesures, après optimisation des conditions de concentration en anticorps anti-2,4-D et en anticorps secondaire, sont présentés sur la Figure 6-6. La différence de signal observée en fonction de la concentration de 2,4-D lors du déplacement est assez faible. De plus, la quantification du signal colorimétrique est difficile avec ce système, du fait du format tridimensionnel du contenant, l'acquisition de l'image est d'une qualité assez basse, et les zones de quantification sont assez aléatoires. Le signal colorimétrique obtenu sur les billes modifiées par du 2,4-D semble néanmoins diminuer pour les fortes concentrations de 2,4-D libre. Le surnageant de déplacement a alors été testé par mesure électrochimique.



	1				2			
Molécule greffée	2,4-D				4-BBA			
[2,4-D]libre (déplacement) µg/mL	a	b	c	d	a	b	c	d
	1000	10	0.1	0	1000	10	0.1	0
Signal colorimétrique (u. a.)	122	143	146	144	106	108	111	106

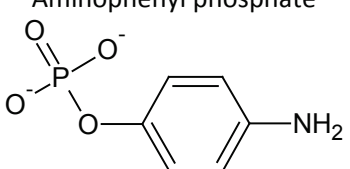
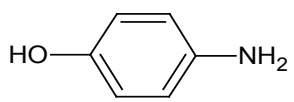
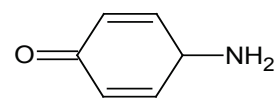
Figure 6-6. Image résultant de l'acquisition après immunoessai en déplacement
1 a. à 1 d. tubes contenant des billes modifiées par du 2,4-D, pour différentes concentrations de 2,4-D libre incubées lors de l'étape de déplacement, 2 a. à 2 d. tubes contrôles.

4.3. MESURE ELECTROCHIMIQUE

4.3.1. MISE AU POINT DU SYSTEME

La mesure électrochimique a été mise au point à l'aide de l'aminophényl phosphate, substrat de la phosphatase alcaline, et de son produit associé, l'aminophénol. Ce produit est transformé par réaction électrochimique en quinonimide. Cette réaction est associée à la perte de 2 électrons, permettant l'apparition d'un signal électrochimique. Ces molécules sont présentées Tableau 6-3.

Tableau 6-3. Substrat et produit de la réaction catalysée par la phosphatase alcaline puis par mesure électrochimique

Réaction enzymatique	Réaction électrochimique	
Aminophényl phosphate 	Aminophénol 	Quinonimide 

Afin de déterminer le potentiel à utiliser pour une mesure en chronoampérométrie, des essais ont été effectués par voltammétrie cyclique sur l'électrode de plastique non modifiée puis sur l'électrode de papier avec le substrat seul, le produit seul, et le substrat en présence de l'enzyme. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la Figure 6-7.

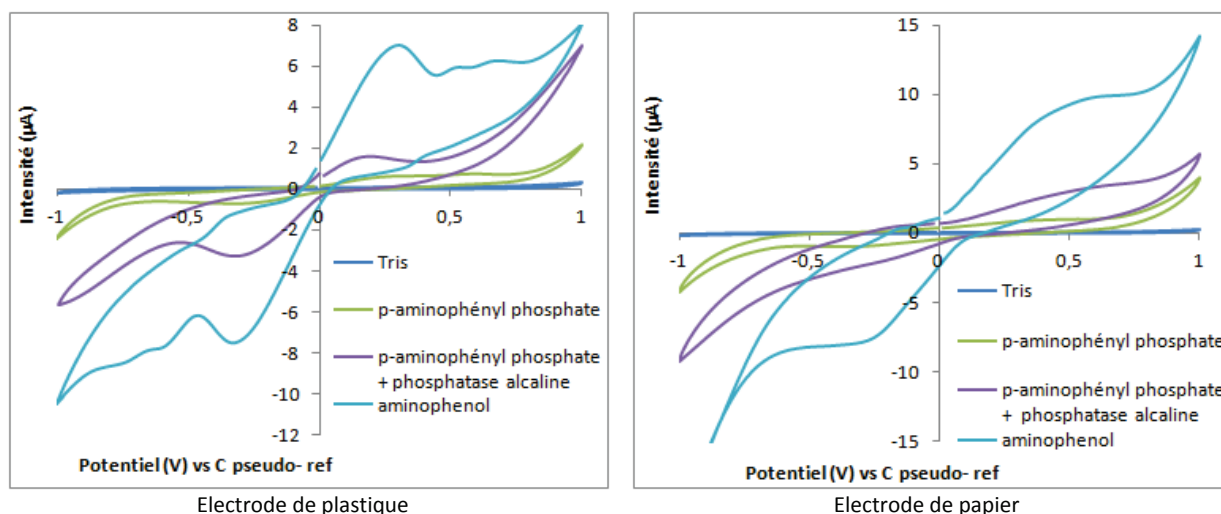


Figure 6-7. Courbes de voltamétrie cyclique en présence du substrat ou produit de la phosphatase alcaline

Ces graphiques présentent l'intensité mesurée sur l'électrode de plastique ou de papier, en faisant varier le potentiel appliqué de façon cyclique de -1 V à $+1$ V, en présence de tampon Tris (courbe bleue foncée), de 10 mM de p-aminophényl phosphate avec (courbe violette) ou sans (courbe verte) anticorps marqués par la phosphatase alcaline à 0,6 mg/L, ou de 10 mM d'aminophénol (courbe bleue claire).

Le voltamogramme réalisé avec l'aminophénol sur l'électrode de plastique présente un pic pour un potentiel de $+0,22$ V. Ce pic est retrouvé, à une intensité moindre, lors de la mesure du p-aminophényl phosphate en présence de l'enzyme, alors qu'il n'apparaît quasiment plus en absence de l'enzyme. De la même façon, on observe ce pic à un potentiel de $+0,5$ V sur l'électrode de papier, moins bien défini, en présence d'aminophénol ou de p-aminophényl phosphate en présence d'enzyme. Ces résultats ont permis de choisir le potentiel de mesure pour le suivi par chronoampérométrie. Ces mesures ont été réalisées à un potentiel de $+0,22$ V sur les électrodes de plastique, et à $+0,5$ V sur les électrodes de papier, les résultats sont présentés sur la Figure 6-8.

Sur les électrodes de plastique, il est possible d'ajouter un composé en cours de mesure. La chronoampérométrie est donc débutée dans du tampon Tris, auquel est ajouté au bout de 120 sec de l'aminophénol (courbe bleue) ou du p-aminophényl phosphate (courbe rouge) tous deux à une concentration finale de 1 mM. L'intensité du courant augmente comme attendu pour l'aminophénol, et très peu pour le p-aminophényl phosphate. Un ajout de phosphatase alcaline à une concentration finale de 0,6 µg/mL (à 600 sec) à la solution contenant le p-aminophényl phosphate permet de visualiser l'augmentation de l'intensité du courant.

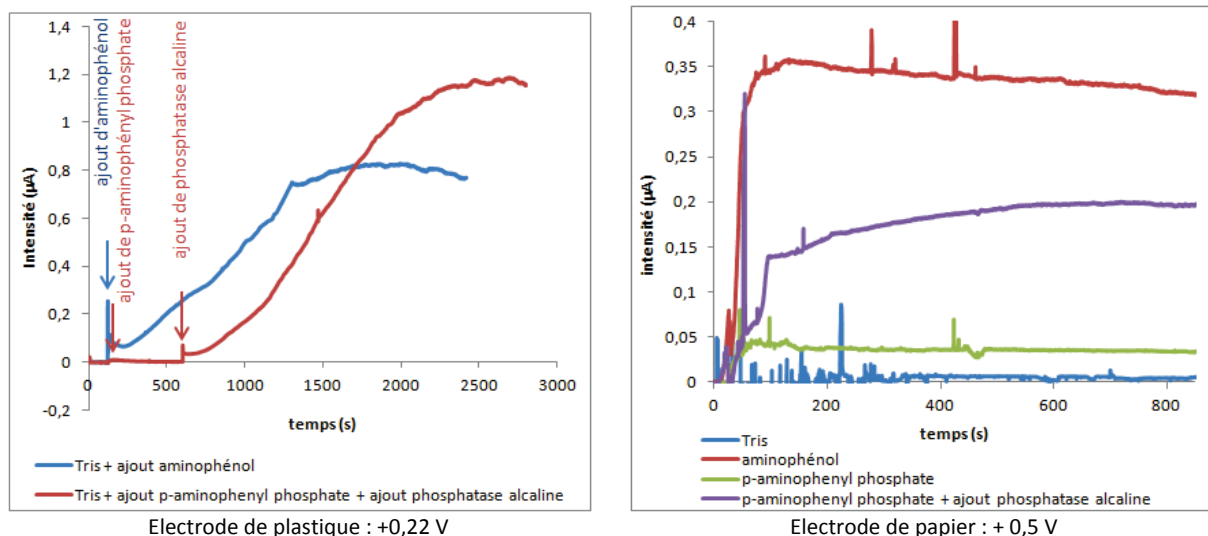


Figure 6-8. Courbes de chronoampérométrie en présence du substrat ou produit de la phosphatase alcaline

Les courbes de gauche représentent l'intensité mesurée en fonction du temps, en présence de tampon tris puis d'aminophénol ou de p-aminophényl phosphate et de phosphatase alcaline, sur l'électrode de plastique avec un potentiel appliqué de + 0,22 V. Celles de droites sont basées sur les mesures effectuées sur l'électrode de papier à un potentiel de + 0,5 V, en présence de tampon, d'aminophénol, de p-aminophényl phosphate ou de p-aminophényl phosphate et de phosphatase alcaline.

Sur les électrodes de papier, les mélanges sont effectués avant dépôt pour ne pas saturer l'électrode dès le premier composé, et la mesure est lancée après 10 secondes d'attente, pour que la solution atteigne l'électrode de travail. La chronoampérométrie est donc réalisée dans quatre conditions différentes. Dans le tampon seul, le courant a une intensité quasi-nulle. Dans l'aminophénol à une concentration de 1 mM, l'intensité du courant augmente fortement, et dans le p-aminophényl phosphate à une concentration de 1 mM seul elle augmente assez peu. Pour la dernière condition, le substrat a été déposé au centre de l'électrode avant toute mesure, et laissé à sécher durant 10 minutes. La solution déposée ensuite ne contient que l'enzyme, à une concentration de 0,6 µg/mL. Cette configuration est celle désirée pour le montage final, pour lequel les électrodes seront préparées à l'avance, et utilisées ensuite en déposant directement le produit résultant du déplacement de l'immunoessai. Dans ce cas-ci (courbe violette) on observe également une augmentation de l'intensité du courant, témoin de la transformation du substrat sec catalysée par la phosphatase alcaline en solution. Le montage semble donc fonctionner.

4.3.2. OPTIMISATION DU SYSTEME

Le montage ayant permis d'obtenir des résultats préliminaires satisfaisants, les conditions ont été optimisées afin d'obtenir la plus grande fiabilité et la meilleure sensibilité possible. Pour cela, différentes concentrations de substrat ont été testées, et les mesures ont été effectuées en présence de gammes de concentration d'enzyme, de manière à évaluer la sensibilité du système. Le résultat de ces mesures est présenté Figure 6-9. Les graphiques du haut de la figure représentent l'intensité du courant en fonction du temps (chronoampérométrie) pour différentes concentrations de phosphatase alcaline. Les courbes en dessous correspondent aux valeurs de l'intensité du courant mesurée à 240 secondes en fonction de la concentration en enzyme, corrigées par l'intensité mesurée en l'absence d'enzyme.

L'analyse de ces courbes souligne plusieurs éléments importants. Tout d'abord, concernant le choix de la concentration de substrat à utiliser, une augmentation de la concentration de substrat permet d'augmenter l'intensité du courant mesurée, on aura donc tendance à choisir la concentration la plus forte possible. Néanmoins, pour une concentration de 500 mM de substrat, l'intensité du courant mesuré dans le tampon est supérieure à celle en présence de l'enzyme pour des concentrations inférieures à 100 µg/L. Ceci est dû au signal donné par le substrat lui-même, qui est négligeable pour de faibles concentrations (voir Figure 6-7) mais pas à des concentrations telles que 500 mM. On se placera donc à une concentration de 100 mM de substrat, afin de limiter le signal du au substrat tout en améliorant l'intensité du signal en présence de l'enzyme.

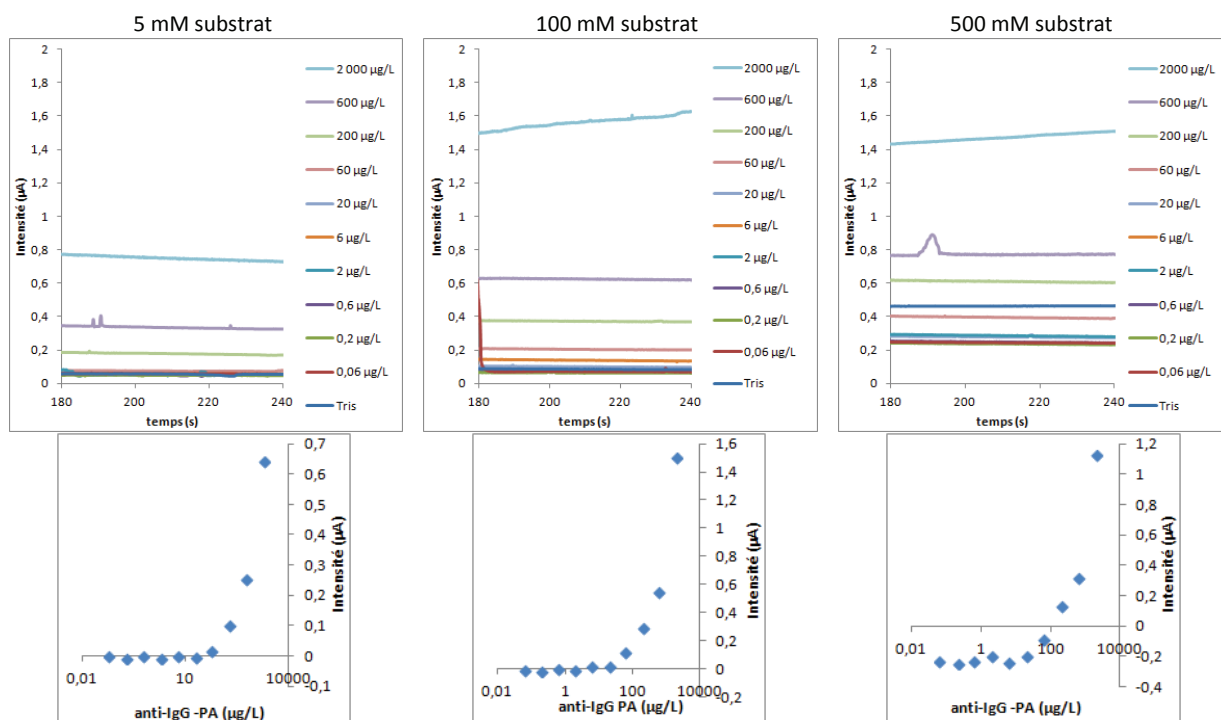


Figure 6-9. Courbes de chronoampérométrie pour différentes concentrations de substrat

Les graphiques de la partie supérieure présentent la mesure électrochimique de l'intensité du courant en fonction du temps, après dépôt de différentes concentrations d'anticorps marqués par la phosphatase alcaline. Ceux de la partie inférieure correspondent aux valeurs de l'intensité du courant mesurée à 240 secondes en fonction de la concentration en anticorps marqués par l'enzyme, après correction par l'intensité obtenue en l'absence d'enzyme.

Par ailleurs, on observe que l'augmentation de la concentration de phosphatase alcaline est liée à une augmentation de l'intensité mesurée, mais uniquement pour des concentrations supérieures à 20 µg/L. Cette concentration définit la limite de détection de notre système. La phosphatase alcaline, protéine d'environ 170 kDa, étant couplée à un anticorps d'environ 150 kDa, la limite de détection calculée est de environ : $20 \cdot 10^{-6} / (170 + 150) \cdot 10^3 = 60 \cdot 10^{-12} \text{ mol/L}$.

4.3.3. ESSAI EN CONDITIONS REELLES APRES DEPLACEMENT

Un test du système a été effectué en mesurant l'intensité du courant en fonction du temps après dépôt du produit de déplacement de différentes concentrations en 2,4-D en immunoessai (Figure 6-10).

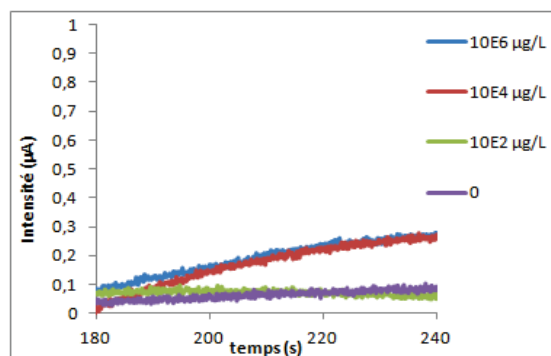


Figure 6-10. Courbes de chronoampérométrie en présence de surnageant de déplacement à différentes concentrations de 2,4-D

Bien que le déplacement en tube ne permette pas encore d'obtenir de résultats satisfaisants, comme décrit au paragraphe 4.2 page 248, la mesure par électrochimie reste prometteuse. En effet, l'intensité mesurée avec les différents surnageants de déplacement semble varier avec la concentration en 2,4-D utilisée pour le déplacement.

4.4. PERSPECTIVES

Pour permettre l'utilisation de cette méthode de détection, il est nécessaire d'améliorer les performances de l'immunoessai en déplacement. Pour cela, on peut imaginer revenir au modèle d'immunoessai en plaque 96 puits, qui a fait ses preuves pour les études précédemment décrites. L'utilisation d'un mode de déplacement plutôt que d'un mode compétitif risque de diminuer la sensibilité de l'essai, néanmoins, la mesure électrochimique ayant démontré une sensibilité importante, on peut imaginer que l'association des deux approches permettrait d'obtenir des résultats satisfaisants.

Conclusion et perspectives

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont porté sur le développement de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique, destinés à plusieurs applications. La première partie a conduit à la mise au point d'un immunoessai multiparamétrique haut-débit pour le diagnostic, basé sur un format biopuce sur support membranaire. Dans un second temps, ce système a été modifié en vue d'une application au contrôle environnemental. L'immunoessai a alors été réalisé en mode compétitif pour le dosage de polluants, avec un support adhésif. Finalement, un autre outil a été développé, dédié à la détection de précurseurs d'explosifs à l'aide d'une puce électrochimique.

SYSTEME DE DETECTION DEDIE AU DIAGNOSTIC

La première partie de cette thèse s'est intéressée au développement d'un outil pour le diagnostic. Le système mis au point dans ce but repose sur la détection des interactions entre des antigènes sondes immobilisés et des anticorps présents dans des échantillons de sérum, par révélation colorimétrique. Il se présente sous la forme d'une micro-plaque standard de 96 puits, dont le fond est constitué d'une membrane poreuse. Ces membranes jouent non seulement le rôle de support pour l'immobilisation des biomolécules en trois dimensions, mais permettent aussi l'incubation et le passage des échantillons, ainsi que le piégeage du précipité coloré témoin de l'interaction. Ainsi, une matrice de biomolécules sondes est intégrée à chaque membrane par dépôt non contact sur la face extérieure (jusqu'à 45 plots dans la présente étude), permettant l'analyse multiparamétrique d'un échantillon par puits. Le protocole est alors réalisé suivant un enchaînement d'étapes de dépôt/incubation/filtration des réactifs, qui facilitent les interactions avec les sondes sur la face extérieure de la membrane, tout en évitant les risques de contamination par piégeage à l'intérieur des puits. Enfin, ce support poreux s'est avéré particulièrement adapté pour la détection colorimétrique. Celle-ci est basée sur l'utilisation d'anticorps marqués par la phosphatase alcaline. Cette enzyme catalyse la dégradation du 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), ce qui permet la formation d'un précipité bleu à partir de Bleu de nitrotétrazolium (NBT). Le précipité ainsi généré est alors retenu dans la membrane. Grâce à ces caractéristiques induisant un rapport signal/bruit très satisfaisant, le système permet une analyse sensible et sélective. En outre, les échantillons peuvent être analysés de façon automatisée, grâce au format micro-plaque classique, compatible avec les chaînes robotisées.

Afin de réaliser la preuve de concept de cet outil pour une application de diagnostic, le système a été éprouvé lors de l'analyse d'échantillons de sérum de patients allergiques, déjà caractérisés par une méthode de référence (le test ImmunoCAP, de la société Phadia). Pour cette application, des sondes allergènes (extraits et protéines recombinantes) ont été immobilisées sous la forme de matrices de plots sur les membranes en fond de puits. L'immunotest multiparamétrique a été réalisé en format capture en une étape, avec l'incubation simultanée des échantillons de sérum contenant les IgE anti-allergènes et des anti-IgE marqués par la phosphatase alcaline. Ainsi, les plots présentant une interaction ont été

directement marqués, puis révélés par un signal colorimétrique. La quantification des résultats, et leur comparaison avec ceux obtenus par ImmunoCAP a permis de déterminer une concordance satisfaisante, en particulier pour les classes présentant la réactivité la plus importante (92 % de concordance des résultats). L'immobilisation de protéines sur le support a donc été validée, et la possibilité de détecter des anticorps dans un échantillon à l'aide de l'outil développé a ainsi été démontrée.

Sur la base des résultats obtenus avec des échantillons caractérisés, la technologie développée a été transférée à une application au diagnostic du cancer, basée sur la détection d'auto-anticorps anti-antigènes associés aux tumeurs dans des échantillons de sérum non caractérisés. Dans cette optique, un panel de TAA a été sélectionné à partir de la littérature, et immobilisé sur le support. L'immunotest multiparamétrique a été effectué en format capture, en deux étapes cette fois de façon à éliminer le signal non-spécifique du à l'importante concentration d'IgG présente dans les échantillons de sérum. Les échantillons ont donc été incubés puis les membranes lavées avant incubation des anticorps secondaires anti-IgG marqués. Après quantification des résultats, une valeur seuil a été déterminée à partir des échantillons de donneurs sains, permettant ensuite la classification des échantillons selon leur positivité ou négativité pour chacun des TAA. L'analyse de l'ensemble des échantillons de sérum de patients atteints de cancer a démontré les performances du test, avec 72,2 % de détermination de positivité basée sur les signaux obtenus sur cinq des TAA du panel. La sensibilité gagnerait toutefois à être améliorée, en affinant les valeurs seuils à l'aide de l'analyse d'échantillon provenant d'une cohorte plus importante de patients et de donneurs. Néanmoins, ces résultats mettent d'ores et déjà en évidence l'importance de l'utilisation d'une combinaison de marqueurs appropriés, et témoignent donc de l'intérêt du caractère multiparamétrique du système développé. De plus, le système développé permettant de définir des signatures de la réactivité des échantillons de sérum, l'implémentation de méthodes chimiométriques pourrait représenter un outil supplémentaire dans l'analyse des résultats de la puce.

SYSTEMES DE DETECTION DEDIES AU CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

Le second axe de recherche est lié à l'environnement et à la sécurité, dans le cadre d'un projet européen, avec le développement d'un outil dédié à la détection de différentes classes de polluants dans l'eau. Ces travaux se sont basés sur le mode déjà utilisé pour le diagnostic, c'est-à-dire sur un immunotest multiparamétrique avec une détection colorimétrique. En revanche, le support, le principe d'immobilisation et le mode d'immunoessai ont été modifiés pour mieux correspondre aux critères impliqués par la détection des molécules sondes de faible poids moléculaire. De plus, afin de pouvoir intégrer ces polluants sondes à une matrice de plots, ceux-ci ont tout d'abord été conjugués à des porteurs de plus haut poids moléculaire. Plusieurs porteurs ont été envisagés pour cela : l'albumine de sérum bovin, des billes de latex, et des polymères de dextran. Après synthèse des conjugués, leur criblage a permis de sélectionner ceux induisant le signal spécifique le plus important. Ils ont alors été intégrés à une matrice pour l'immunotest. Le nouveau format de test consiste en une micro-plaque 96 puits sans fond, qui est assemblée avec un adhésif transparent présentant les matrices de sondes au niveau de chaque puits. L'adhésif sert donc non seulement de support d'immobilisation, mais aussi à

l'assemblage de ces matrices en fond de puits. De plus, il a démontré une rétention importante des précipités colorés (Le Goff *et al.* 2012), donc une bonne définition des plots après révélation. Concernant l'immunoessai en lui-même, il est réalisé selon un mode compétitif, en procédant à l'incubation de l'échantillon en présence d'un mélange des anticorps spécifiquement dirigés contre les cibles. Le taux d'anticorps fixés sur les plots dépend dans cette configuration de la concentration en cibles de l'échantillon. Après calibration de l'essai en format monoparamétrique, l'analyse d'échantillons de différentes compositions en cibles est effectuée. La détermination des concentrations s'est révélée exacte dans 82,5 % des cas, les approximations étant dues à des réactions croisées non-éliminées. Ces résultats sont très prometteurs, et laissent envisager une implémentation du système à d'autres polluants. De plus, l'utilisation de méthodes chimiométriques pourrait améliorer ses performances, par la définition de signatures permettant d'atteindre une meilleure sélectivité en tirant partie de la variabilité due à la réactivité croisée. Néanmoins, le système devra être éprouvé en conditions réelles (avec des prélèvements d'eau potentiellement contaminée) afin de valider son potentiel d'utilisation pour le contrôle de la qualité de l'eau.

Enfin, la dernière partie de cette thèse s'est intéressée au développement d'un autre type de test pour le contrôle de l'eau. Pour les besoins du projet européen BONAS, un capteur devait permettre la détection de précurseurs de synthèse d'explosifs dans les eaux usées à proximité d'un emplacement suspecté de fabrication de bombe artisanale. Les composés définis comme les cibles prioritaires étant des molécules ne générant pas de réponse immunitaire, un immunocapteur ne pouvait être envisagé. Le choix du type de test s'est porté sur une détection électrochimique, apportant différents avantages non négligeables dans ce contexte. En effet, une puce électrochimique de faible coût, portable, jetable et simple à utiliser a pu être fabriquée par une méthode de sérigraphie. Le principe du test réside dans la mesure d'un échantillon par voltammétrie cyclique, et dans la comparaison du signal obtenu avec les signaux établis comme des signatures spécifiques d'un composé. Afin de définir des signatures précises, différentes surfaces de mesure ont été générées par électrodépôt de métaux sur les différentes électrodes de travail. Les différentes courbes correspondant à ces différentes surfaces permettent une importante amélioration de la sélectivité. Après construction d'une base de données de signatures, il a été possible d'identifier les composés cibles par comparaison avec les signatures prédéfinies. Une analyse statistique (en composantes principales) a ensuite permis d'évaluer la précision des résultats, et de démontrer la nécessité d'utilisation des différentes surfaces de mesures. Bien que l'objectif de ce capteur soit l'identification de composés, et non pas leur quantification, le système pourrait être amélioré en précisant la définition des signatures, en fonction des concentrations en composé. Cela nécessiterait de réaliser un grand nombre de mesures, avec des gammes de concentration des différents composés. Une autre perspective consisterait à utiliser la puce électrochimique intégrée à un appareillage développé par l'un des partenaires du projet, permettant de prélever des échantillons de vapeur et de les concentrer sous forme liquide. Ainsi, les composés cibles présents dans l'air pourraient également être détectés à l'aide du capteur électrochimique. Enfin, le déploiement du système dans un scénario test mis en place par le projet BONAS sera effectué dans la dernière phase du projet, afin d'évaluer ses performances en conditions réelles.

La dernière partie du travail effectué au cours de la thèse a finalement été de réfléchir à la manière d'utiliser les différents blocs composant les outils développés afin de mettre au point un nouveau format d'immunotest à détection électrochimique. Cette partie consiste en une étude préliminaire, démontrant le potentiel d'utilisation d'une électrode de papier pour détecter des anticorps par voie électrochimique, après déplacement par interaction avec les cibles d'un échantillon. Le principe réside en la catalyse par la phosphatase alcaline marquant les anticorps, de la transformation d'un substrat sec déposé dans le papier en un produit électrochimiquement actif. Ce système pourrait donc tirer partie de la synthèse de conjugués sur les billes de latex (empêchant la diffusion des conjugués dans le papier), d'un support membranaire, d'un immunotest en mode compétitif, d'un marquage par une enzyme des anticorps secondaires, et d'une détection électrochimique à bas coût. La suite de cette étude consistera en l'intégration des différentes parties du système (immunotest et détection électrochimique) en un outil d'analyse et en son optimisation.

Références

- Adam, B. L., Y. S. Qu, J. W. Davis, M. D. Ward, M. A. Clements, L. H. Cazares, O. J. Semmes, P. F. Schellhammer, Y. Yasui, Z. D. Feng, *et al.* (2002). "Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men." Cancer Research **62**(13): 3609-3614.
- Afanassiev, V., V. Hanemann and S. Wolfl (2000). "Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film." Nucleic Acids Research **28**(12): 5.
- Alvarez, M. and L. M. Lechuga (2010). "Microcantilever-based platforms as biosensing tools." Analyst **135**(5): 827-836.
- Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nature Medicine **3**(8): 917-921.
- Amine, A., H. Mohammadi, I. Bourais and G. Palleschi (2006). "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring." Biosensors and Bioelectronics **21**(8): 1405-1423.
- Anderson, K. S., S. Sibani, G. Wallstrom, J. Qiu, E. A. Mendoza, J. Raphael, E. Hainsworth, W. R. Montor, J. Wong, J. G. Park, *et al.* (2010). "Protein Microarray Signature of Autoantibody Biomarkers for the Early Detection of Breast Cancer." Journal of Proteome Research **10**(1): 85-96.
- Andersson, H., C. Jonsson, C. Moberg and G. Stemme (2002). "Self-assembled and self-sorted array of chemically active beads for analytical and biochemical screening." Talanta **56**(2): 301-308.
- Angelopoulou, K. and E. P. Diamandis (1997). "Detection of the TP53 tumour suppressor gene product and p53 auto-antibodies in the ascites of women with ovarian cancer." European Journal of Cancer **33**(1): 115-121.
- Anzenbacher, J. P., P. Lubal, P. Bucek, M. A. Palacios and M. E. Kozelkova (2010). "A practical approach to optical cross-reactive sensor arrays." Chemical Society Reviews **39**(10): 3954-3979.
- Aragay, G., F. Pino and A. Merkoçi (2012). "Nanomaterials for Sensing and Destroying Pesticides." Chemical Reviews **112**(10): 5317-5338.
- Asero, R., B. K. Ballmer-Weber, K. Beyer, A. Conti, R. Dubakiene, M. Fernandez-Rivas, K. Hoffmann-Sommergruber, J. Lidholm, T. Mustakov, J. N. G. Oude Elberink, *et al.* (2007). "IgE-Mediated food allergy diagnosis: Current status and new perspectives." Molecular Nutrition & Food Research **51**(1): 135-147.
- Avseenko, N. V., T. Y. Morozova, F. I. Ataullakhanov and V. N. Morozov (2001). "Immobilization of Proteins in Immunochemical Microarrays Fabricated by Electrospray Deposition." Analytical Chemistry **73**(24): 6047-6052.
- Babel, I., R. Barderas, R. Diaz-Uriarte, J. L. Martinez-Torrecuadrada, M. Sanchez-Carbayo and J. I. Casal (2009). "Identification of Tumor-associated Autoantigens for the Diagnosis of Colorectal Cancer in Serum Using High Density Protein Microarrays." Molecular & Cellular Proteomics **8**(10): 2382-2395.
- Baibich, M. N., J. M. Broto, A. Fert, F. N. Vandau, F. Petroff, P. Eitenne, G. Creuzet, A. Friederich and J. Chazelas (1988). "Giant magnetoresistance of (001)Fe/(001)Cr magnetic superlattices." Physical Review Letters **61**(21): 2472-2475.
- Bajaj, A., O. R. Miranda, I.-B. Kim, R. L. Phillips, D. J. Jerry, U. H. F. Bunz and V. M. Rotello (2009). "Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(27): 10912-10916.
- Ballmer-Weber, B. K., K. Skamstrup Hansen, J. Sastre, K. Andersson, I. Bättscher, J. Östling, L. Dahl, K. M. Hanschmann, T. Holzhauser, L. K. Poulsen, *et al.* (2012). "Component-resolved in vitro diagnosis of carrot allergy in three different regions of Europe." Allergy **67**(6): 758-766.

- Barbulovic-Nad, I., M. Lucente, Y. Sun, M. J. Zhang, A. R. Wheeler and M. Bussmann (2006). "Bio-microarray fabrication techniques - A review." Critical Reviews in Biotechnology **26**(4): 237-259.
- Bart, J. C., L. L. Judd, K. E. Hoffman, A. M. Wilkins and A. W. Kusterbeck (1997). "Application of a Portable Immunosensor To Detect the Explosives TNT and RDX in Groundwater Samples." Environmental Science & Technology **31**(5): 1505-1511.
- Barzen, C., A. Brecht and G. Gauglitz (2002). "Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control." Biosensors and Bioelectronics **17**(4): 289-295.
- Bebeselea, A., F. Manea, G. Burtica, L. Nagy and G. Nagy (2010). "The electrochemical determination of phenolic derivatives using multiple pulsed amperometry with graphite based electrodes." Talanta **80**(3): 1068-1072.
- Beck, S. and H. Koster (1990). "Applications of dioxetane chemiluminescent probes to molecular-biology." Analytical Chemistry **62**(21): 2258-2270.
- Belleville, E., M. Dufva, J. Aamand, L. Bruun and C. B. Christensen (2003). "Quantitative assessment of factors affecting the sensitivity of a competitive immunomicroarray for pesticide detection." Biotechniques **35**(5): 1044-1051.
- Benchimol, S., A. Fuks, S. Jothy, N. Beauchemin, K. Shirota and C. P. Stanners (1989). "Carcinoembryonic antigen, a human-tumor marker, functions as an intercellular-adhesion molecule." Cell **57**(2): 327-334.
- Benmahrez, K., D. Thierry, I. Sorokine, A. Dannamuller and M. Kohiyama (1988). "Detection Of Circulating Antibodies Against C-Myc Protein In Cancer-Patient Sera." British Journal Of Cancer **57**(6): 529-534.
- Bhalla, P. L. and M. B. Singh (2008). "Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination." Trends in Biotechnology **26**(3): 153-161.
- Bhand, S., I. Surugiu, A. Dzgoev, K. Ramanathan, P. V. Sundaram and B. Danielsson (2005). "Immuno-arrays for multianalyte analysis of chlorotriazines." Talanta **65**(2): 331-336.
- Biagini, R. E., J. P. Smith, D. L. Sammons, B. A. MacKenzie, C. A. F. Striley, S. K. Robertson and J. E. Snawder (2004). "Development of a sensitivity enhanced multiplexed fluorescence covalent microbead immunosorbent assay (FCMIA) for the measurement of glyphosate, atrazine and metolachlor mercapturate in water and urine." Analytical and Bioanalytical Chemistry **379**(3): 368-374.
- Blawas, A. S. and W. M. Reichert (1998). "Protein patterning." Biomaterials **19**(7-9): 595-609.
- Blum, L. J. (1997). Bio- and chemi-luminescent sensors.
- Bock, C., M. Coleman, B. Collins, J. Davis, G. Foulds, L. Gold, C. Greef, J. Heil, J. S. Heilig, B. Hicke, *et al.* (2004). "Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis." Proteomics **4**(3): 609-618.
- Boisen, A., S. Dohn, S. S. Keller, S. Schmid and M. Tenje (2011). "Cantilever-like micromechanical sensors." Reports on Progress in Physics **74**(3).
- Bosco, F. G., M. Bache, E. T. Hwu, C. H. Chen, S. S. Andersen, K. A. Nielsen, S. S. Keller, J. O. Jeppesen, I. S. Hwang and A. Boisen (2012). "Statistical analysis of DNT detection using chemically functionalized microcantilever arrays." Sensors and Actuators B-Chemical **171**: 1054-1059.
- Bottero, J., A. Boyd, J. Gozlan, M. Lemoine, F. Carrat, A. Collignon, N. Boo, P. Dhotte, B. Varsat, G. Muller, *et al.* (2013). "Performance of rapid tests for detection of HBsAg and anti-HBsAb in a large cohort, France." Journal of Hepatology **58**(3): 473-478.
- Botti, S., S. Almaviva, L. Cantarini, A. Palucci, A. Puiu and A. Rufoloni (2013). "Trace level detection and identification of nitro-based explosives by surface-enhanced Raman spectroscopy." Journal of Raman Spectroscopy **44**(3): 463-468.
- Bovenizer, J. S., M. B. Jacobs, C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault (1998). "The detection of *Pseudomonas aeruginosa* using the quartz crystal microbalance." Analytical Letters **31**(8): 1287-1295.

- Bowen, N. J., S. Logani, E. B. Dickerson, L. B. Kapa, M. Akhtar, B. B. Benigno and J. F. McDonald (2007). "Emerging roles for PAX8 in ovarian cancer and endosalpingeal development." Gynecologic Oncology **104**(2): 331-337.
- Boyle, P., C. J. Chapman, S. Holdenrieder, A. Murray, C. Robertson, W. C. Wood, P. Maddison, G. Healey, G. H. Fairley, A. C. Barnes, *et al.* (2011). "Clinical validation of an autoantibody test for lung cancer." Annals of Oncology **22**(2): 383-389.
- Bradford, M. M. (1976). "Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Bradley, S. V., K. I. Oravecz-Wilson, G. Bougeard, I. Mizukami, L. Li, A. J. Munaco, A. Sreekumar, M. N. Corradetti, A. M. Chinnaiyan, M. G. Sanda, *et al.* (2005). "Serum antibodies to huntingtin interacting protein-1: A new blood test for prostate cancer." Cancer Research **65**(10): 4126-4133.
- Brawer, M. K., M. P. Chetner, J. Beatie, D. M. Buchner, R. L. Vessella and P. H. Lange (1992). "Screening For Prostatic-Carcinoma With Prostate Specific Antigen." Journal Of Urology **147**(3): 841-845.
- Brockman, J. M., A. G. Frutos and R. M. Corn (1999). "A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging." Journal of the American Chemical Society **121**(35): 8044-8051.
- Buchapudi, K. R., X. Huang, X. Yang, H. F. Ji and T. Thundat (2011). "Microcantilever biosensors for chemicals and bioorganisms." Analyst **136**(8): 1539-1556.
- Burks, R. and D. Hage (2009). "Current trends in the detection of peroxide-based explosives." Analytical and Bioanalytical Chemistry **395**(2): 301-313.
- Campàs, M., B. Prieto-Simón and J.-L. Marty (2007). "Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety." Talanta **72**(3): 884-895.
- Campbell, C. T. and G. Kim (2007). "SPR microscopy and its applications to high-throughput analyses of biomolecular binding events and their kinetics." Biomaterials **28**(15): 2380-2392.
- Campbell, K., L. D. Stewart, G. J. Doucette, T. L. Fodey, S. A. Haughey, N. Vilariño, K. Kawatsu and C. T. Elliott (2007). "Assessment of Specific Binding Proteins Suitable for the Detection of Paralytic Shellfish Poisons Using Optical Biosensor Technology." Analytical Chemistry **79**(15): 5906-5914.
- Campo, A. and I. Bruce (2005). Substrate Patterning and Activation Strategies for DNA Chip Fabrication. Immobilisation of DNA on Chips I. C. Wittmann, Springer Berlin Heidelberg. **260**: 77-111.
- Canney, P. A., M. Moore, P. M. Wilkinson and R. D. James (1984). "Ovarian-cancer antigen ca125 - a prospective clinical-assessment of its role as a tumor-marker." British Journal of Cancer **50**(6): 765-769.
- Carpelanholmstrom, M., C. Haglund, P. Kuusela, H. Jarvinen and P. J. Roberts (1995). "Preoperative serum levels of cea and ca-242 in colorectal-cancer." British Journal of Cancer **71**(4): 868-872.
- Casiano, C. A., M. Mediavilla-Varela and E. M. Tan (2006). "Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer." Molecular & Cellular Proteomics **5**(10): 1745-1759.
- Caygill, J. S., F. Davis and S. P. J. Higson (2012). "Current trends in explosive detection techniques." Talanta **88**(0): 14-29.
- Centi, S., S. Laschi and M. Mascini (2007). "Improvement of analytical performances of a disposable electrochemical immunosensor by using magnetic beads." Talanta **73**(2): 394-399.
- Chapman, C., A. Murray, J. Chakrabarti, A. Thorpe, C. Woolston, U. Sahin, A. Barnes and J. Robertson (2007). "Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis." Annals of Oncology **18**(5): 868-873.
- Chapman, K. (2002). "The ProteinChip (R) Biomarker System from Ciphergen Biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation." Biochemical Society Transactions **30**: 82-87.

- Charles, P. T., E. R. Goldman, J. G. Rangasammy, C. L. Schauer, M. S. Chen and C. R. Taitt (2004). "Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications." *Biosensors & Bioelectronics* **20**(4): 753-764.
- Cheever, M. A., M. L. Disis, H. Bernhard, J. R. Gralow, S. L. Hand, E. S. Huseby, H. L. Qin, M. Takahashi and W. Chen (1995). "Immunity to oncogenic proteins." *Immunological Reviews* **145**: 33-59.
- Chen, D. S. and J. L. Sung (1977). "Serum alphafetoprotein in hepatocellular carcinoma." *Cancer* **40**(2): 779-783.
- Chen, H., C. Jiang, C. Yu, S. Zhang, B. Liu and J. Kong (2009). "Protein chips and nanomaterials for application in tumor marker immunoassays." *Biosensors and Bioelectronics* **24**(12): 3399-3411.
- Chen, J.-C., J.-L. Shih, C.-H. Liu, M.-Y. Kuo and J.-M. Zen (2006). "Disposable Electrochemical Sensor for Determination of Nitroaromatic Compounds by a Single-Run Approach." *Analytical Chemistry* **78**(11): 3752-3757.
- Chikkaveeraiah, B. V., A. A. Bhirde, N. Y. Morgan, H. S. Eden and X. Chen (2012). "Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers." *ACS Nano* **6**(8): 6546-6561.
- Choi, Y.-E., J.-W. Kwak and J. W. Park (2010). "Nanotechnology for Early Cancer Detection." *Sensors* **10**(1): 428-455.
- Chou, M., S. Kim, N. Khim, S. Chy, S. Sum, D. Dourng, L. Canier, C. Nguon and D. Menard (2012). "Performance of "VIKIA Malaria Ag Pf/Pan" (IMACCESS (R)), a new malaria rapid diagnostic test for detection of symptomatic malaria infections." *Malaria Journal* **11**.
- Chung, J.-Y., H. Kitano, M. Takikita, H. Cho, K. H. Noh, T. W. Kim, K. Ylaya, J. Hanaoka, J. Fukuoka and S. M. Hewitt (2013). "Synaptonemal complex protein 3 as a novel prognostic marker in early stage non-small cell lung cancer." *Human Pathology* **44**(4): 472-479.
- Corgier, B. P., F. Li, L. J. Blum and C. A. Marquette (2007). "On-Chip Chemiluminescent Signal Enhancement Using Nanostructured Gold-Modified Carbon Microarrays." *Langmuir* **23**(16): 8619-8623.
- Corgier, B. P., C. A. Mandon, G. C. Le Goff, L. J. Blum and C. A. Marquette (2011). "Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools." *Lab on a Chip* **11**(17): 3006-3010.
- Corgier, B. P., C. A. Marquette and L. J. Blum (2005a). "Diazonium-protein adducts for graphite electrode microarrays modification: Direct and addressed electrochemical immobilization." *Journal of the American Chemical Society* **127**(51): 18328-18332.
- Corgier, B. P., C. A. Marquette and L. J. Blum (2005b). "Screen-printed electrode microarray for electrochemiluminescent measurements." *Analytica Chimica Acta* **538**(1-2): 1-7.
- Covini, G., E. K. L. Chan, M. Nishioka, S. A. Morshed, S. I. Reed and E. M. Tan (1997). "Immune response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **25**(1): 75-80.
- Crawford, L. V., D. C. Pim and R. D. Bulbrook (1982). "Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast-cancer." *International Journal of Cancer* **30**(4): 403-408.
- Cretich, M., D. Breda, F. Damin, M. Borghi, L. Sola, S. Unlu, S. Burastero and M. Chiari (2010). "Allergen microarrays on high-sensitivity silicon slides." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **398**(4): 1723-1733.
- Danielson, U. H. (2009). "Fragment Library Screening and Lead Characterization Using SPR Biosensors." *Current Topics in Medicinal Chemistry* **9**(18): 1725-1735.
- Deinhofer, K., H. Sevcik, N. Balic, C. Harwanegg, R. Hiller, H. Rumpold, M. W. Mueller and S. Spitzauer (2004). "Microarrayed allergens for IgE profiling." *Methods* **32**(3): 249-254.
- Deiss, F., C. N. LaFratta, M. Symer, T. M. Blicharz, N. Sojic and D. R. Walt (2009). "Multiplexed Sandwich Immunoassays Using Electrochemiluminescence Imaging Resolved at the Single Bead Level." *Journal of the American Chemical Society* **131**(17): 6088-+.
- Desmetz, C., A. Mange, T. Maudelonde and J. Solassol (2011). "Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **15**(10): 2013-2024.

- Desmetz, C., T. Maudelonde, A. Mange and J. Solassol (2009). "Identifying autoantibody signatures in cancer: a promising challenge." Expert Review of Proteomics **6**(4): 377-386.
- Dhar, D. K., S. W. M. Olde Damink, J. H. Brindley, A. Godfrey, M. H. Chapman, N. S. Sandanayake, F. Andreola, S. Mazurek, T. Hasan, M. Malago, *et al.* (2013). "Pyruvate kinase M2 is a novel diagnostic marker and predicts tumor progression in human biliary tract cancer." Cancer **119**(3): 575-585.
- Diaz, T., M. D. B. Almeida, I. Georg, S. D. Maia, R. V. de Souza and L. E. Markowitz (2004). "Evaluation of the determine rapid syphilis TP assay using sera." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **11**(1): 98-101.
- Dill, K., A. Ghindilis and K. Schwarzkopf (2006). "Multiplexed analyte and oligonucleotide detection on microarrays using several redox enzymes in conjunction with electrochemical detection." Lab on a Chip **6**(8): 1052-1055.
- Disis, M. L., S. M. Pupa, J. R. Gralow, R. Dittadi, S. Menard and M. A. Cheever (1997). "High-titer HER-2/neu protein-specific antibody can be detected in patients with early-stage breast cancer." Journal of Clinical Oncology **15**(11): 3363-3367.
- Donaldson, D. N., N. W. Barnett, K. M. Agg, D. Graham, C. E. Lenehan, C. Prior, K. F. Lim and P. S. Francis (2012). "Chemiluminescence detection of 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane (RDX) and related nitramine explosives." Talanta **88**(0): 743-748.
- Dostálek, J., J. Přibyl, J. Homola and P. Skládal (2007). "Multichannel SPR biosensor for detection of endocrine-disrupting compounds." Analytical and Bioanalytical Chemistry **389**(6): 1841-1847.
- Doyle, G. A., J. M. Bourdeau-Heller, S. Coulthard, L. P. Meisner and J. Ross (2000). "Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein." Cancer Research **60**(11): 2756-2759.
- Dubois, M., L. Demoulin, C. Charlier, G. Singh, S. B. Godefroy, K. Campbell, C. T. Elliott and P. Delahaut (2010). "Development of ELISAs for detecting domoic acid, okadaic acid, and saxitoxin and their applicability for the detection of marine toxins in samples collected in Belgium." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **27**(6): 859-868.
- Duckworth, B. P., J. H. Xu, T. A. Taton, A. Guo and M. D. Distefano (2006). "Site-specific, covalent attachment of proteins to a solid surface." Bioconjugate Chemistry **17**(4): 967-974.
- Duffy, M. J. (2006). "Serum tumor markers in breast cancer: Are they of clinical value?" Clinical Chemistry **52**(3): 345-351.
- Dufva, M. (2005). "Fabrication of high quality microarrays." Biomolecular Engineering **22**(5-6): 173-184.
- Ekins, R. P. and F. W. Chu (1991). "Multianalyte microspot immunoassay - microanalytical compact-disk of the future." Clinical Chemistry **37**(11): 1955-1967.
- EPA, U. S. (1988). Criteria and Health Advisory for Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Standards Division Office of Drinking Water Report. Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency
- EPA, U. S. (1989). Criteria and Health Advisory for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Standards Division Office of Drinking Water Report. Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency
- EPA, U. S. (2000). Determination of chlorinated acids in drinking water by liquid liquid microextraction, derivatization, and fast gas chromatography with electron capture detection, Method 515.4, Revision 1.0. Office of Ground Water and Drinking Water Report. Cincinnati, OHIO, U.S. Environmental Protection Agency
- EPA, U. S. (2005a). Determination of selected pesticides and flame retardants in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry, Method 527, Revision 1.0 Office of Ground Water and Drinking Water Report. Cincinnati, OHIO, U.S. Environmental Protection Agency
- EPA, U. S. (2005b). Technologies and Techniques for Early Warning Systems to Monitor and Evaluate Drinking Water Quality: State-of-the-Art Review. Office of Research and Development National Homeland Security Research Center Research Report, U.S. Environmental Protection Agency

- Epstein, J. R., J. A. Ferguson, K. H. Lee and D. R. Walt (2003). "Combinatorial decoding: An approach for universal DNA array fabrication." *Journal of the American Chemical Society* **125**(45): 13753-13759.
- Epstein, J. R., M. Lee and D. R. Walt (2002). "High-density fiber-optic genosensor microsphere array capable of zeptomole detection limits." *Analytical Chemistry* **74**(8): 1836-1840.
- Fall, B. I., B. Eberlein-König, H. Behrendt, R. Niessner, J. Ring and M. G. Weller (2002). "Microarrays for the Screening of Allergen-Specific IgE in Human Serum." *Analytical Chemistry* **75**(3): 556-562.
- Falsey, J. R., M. Renil, S. Park, S. J. Li and K. S. Lam (2001). "Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays." *Bioconjugate Chemistry* **12**(3): 346-353.
- Faye, C., E. Chautard, B. R. Olsen and S. Ricard-Blum (2009). "The First Draft of the Endostatin Interaction Network." *Journal of Biological Chemistry* **284**(33): 22041-22047.
- Feng, L.-N., Z.-P. Bian, J. Peng, F. Jiang, G.-H. Yang, Y.-D. Zhu, D. Yang, L.-P. Jiang and J.-J. Zhu (2012). "Ultrasensitive Multianalyte Electrochemical Immunoassay Based on Metal Ion Functionalized Titanium Phosphate Nanospheres." *Analytical Chemistry* **84**(18): 7810-7815.
- Fernandez-Madrid, F., N. M. Tang, H. Alansari, J. L. Granda, L. Tait, K. C. Amirikia, M. Moroianu, X. J. Wang and R. L. Karvonen (2004). "Autoantibodies to annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer." *Cancer Research* **64**(15): 5089-5096.
- Fernandezlafuente, R., C. M. Rosell, V. Rodriguez, C. Santana, G. Soler, A. Bastida and J. M. Guisan (1993). "Preparation of activated supports containing low pk amino-groups - a new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method." *Enzyme and Microbial Technology* **15**(7): 546-550.
- Fishman, P., O. Merimski, E. Baharav and Y. Shoenfeld (1997). "Autoantibodies to tyrosinase - The bridge between melanoma and vitiligo." *Cancer* **79**(8): 1461-1464.
- Fodor, S. P. A., J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu and D. Solas (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." *Science* **251**(4995): 767-773.
- Frank, R. (2002). "The SPOT synthesis technique - Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications." *Journal of Immunological Methods* **267**(1): 13-26.
- Franzeck, F. C., R. Ngwale, B. Msongole, M. Hamisi, O. Abdul, L. Henning, E. Letang, G. Mwaigomole, M. Battegay, C. Hatz, *et al.* (2013). "Viral Hepatitis and Rapid Diagnostic Test Based Screening for HBsAg in HIV-infected Patients in Rural Tanzania." *Plos One* **8**(3).
- Frelinger, J., J. Ottinger, C. Gouttefangeas and C. Chan (2010). "Modeling flow cytometry data for cancer vaccine immune monitoring." *Cancer Immunology Immunotherapy* **59**(9): 1435-1441.
- Freymy, J. M., L. Puech, S. Kryszewski and S. Dragacci (1999). "Recent advances in analytical procedures for the detection of diarrhetic phycotoxins: a review." *Journal of Applied Phycology* **11**(4): 377-384.
- Fu, Z., Z. Yang, J. Tang, H. Liu, F. Yan and H. Ju (2007). "Channel and Substrate Zone Two-Dimensional Resolution for Chemiluminescent Multiplex Immunoassay." *Analytical Chemistry* **79**(19): 7376-7382.
- Gabaldón, J. A., J. M. Cascales, S. Morias, A. Maquieira and R. Puchades (2003). "Determination of atrazine and carbaryl pesticide residues in vegetable samples using a multianalyte dipstick immunoassay format." *Food Additives & Contaminants* **20**(8): 707-715.
- Garthwaite, I., K. M. Ross, C. O. Miles, L. R. Briggs, N. R. Towers, T. Borrell and P. Busby (2001). "Integrated enzyme-linked immunosorbent assay screening system for amnesic, neurotoxic, diarrhetic, and paralytic shellfish poisoning toxins found in New Zealand." *JAOAC Int* **84**(5): 1643-1648.
- Gaster, R. S., D. A. Hall, C. H. Nielsen, S. J. Osterfeld, H. Yu, K. E. Mach, R. J. Wilson, B. Murmann, J. C. Liao, S. S. Gambhir, *et al.* (2009). "Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine." *Nature Medicine* **15**(11): 1327-U1130.

- Ge, S., F. Yu, L. Ge, M. Yan, J. Yu and D. Chen (2012). "Disposable electrochemical immunosensor for simultaneous assay of a panel of breast cancer tumor markers." *Analyst* **137**(20): 4727-4733.
- Ginger, D. S., H. Zhang and C. A. Mirkin (2004). "The Evolution of Dip-Pen Nanolithography." *Angewandte Chemie International Edition* **43**(1): 30-45.
- Girotti, S., S. Eremin, A. Montoya, M. J. Moreno, P. Caputo, M. D'Elia, L. Ripani, F. S. Romolo and E. Maiolini (2010). "Development of a chemiluminescent ELISA and a colloidal gold-based LFIA for TNT detection." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 687-695.
- Girotti, S., E. Ferri, E. Maiolini, L. Bolelli, M. D'Elia, D. Coppe and F. S. Romolo (2011). "A quantitative chemiluminescent assay for analysis of peroxide-based explosives." *Analytical And Bioanalytical Chemistry* **400**(2): 313-320.
- Goluch, E. D., S. I. Stoeva, J.-S. Lee, K. A. Shaikh, C. A. Mirkin and C. Liu (2009). "A microfluidic detection system based upon a surface immobilized biobarcode assay." *Biosensors and Bioelectronics* **24**(8): 2397-2403.
- Govindaraju, T., P. Jonkheijm, L. Gogolin, H. Schroeder, C. F. W. Becker, C. M. Niemeyer and H. Waldmann (2008). "Surface immobilization of biomolecules by click sulfonamide reaction." *Chemical Communications*(32): 3723-3725.
- Gunawardana, C. G. and E. P. Diamandis (2007). "High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens." *Cancer Letters* **249**(1): 110-119.
- Guo, Y.-R., S.-Y. Liu, W.-J. Gui and G.-N. Zhu (2009). "Gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of carbofuran and triazophos in water samples." *Analytical Biochemistry* **389**(1): 32-39.
- Guo, Y., J. Tian, C. Liang, G. Zhu and W. Gui (2013). "Multiplex bead-array competitive immunoassay for simultaneous detection of three pesticides in vegetables." *Microchimica Acta* **180**(5-6): 387-395.
- Guschin, D., G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov and A. Mirzabekov (1997). "Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips." *Analytical Biochemistry* **250**(2): 203-211.
- Ha, D., N. Hu, C. X. Wu, D. Kirsanov, A. Legin, M. Khaydukova and P. Wang (2012). "Novel structured light-addressable potentiometric sensor array based on PVC membrane for determination of heavy metals." *Sensors and Actuators B: Chemical* **174**(0): 59-64.
- Han, Y., W. W. Tu, Y. G. Wen, D. P. Li, G. Q. Qiu, H. M. Tang, Z. H. Peng and C. Z. Zhou (2013). "Identification and validation that up-expression of HOXA13 is a novel independent prognostic marker of a worse outcome in gastric cancer based on immunohistochemistry." *Med Oncol* **30**(2): 564.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Harwanegg, C., S. Laffer, R. Hiller, M. W. Mueller, D. Kraft, S. Spitzauer and R. Valenta (2003). "Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy." *Clinical and Experimental Allergy* **33**(1): 7-13.
- Hayat, A., L. Barthelmebs and J.-L. Marty (2011). "Enzyme-linked immunosensor based on super paramagnetic nanobeads for easy and rapid detection of okadaic acid." *Analytica Chimica Acta* **690**(2): 248-252.
- Hayat, A., L. Barthelmebs, A. Sassolas and J.-L. Marty (2012). "Development of a novel label-free amperometric immunosensor for the detection of okadaic acid." *Analytica Chimica Acta* **724**(0): 92-97.
- He, M., O. Stoevesandt, E. A. Palmer, F. Khan, O. Ericsson and M. J. Taussig (2008a). "Printing protein arrays from DNA arrays." *Nat Methods* **5**(2): 175-177.
- He, M., O. Stoevesandt and M. J. Taussig (2008b). "In situ synthesis of protein arrays." *Current Opinion in Biotechnology* **19**(1): 4-9.
- Heyries, K. A., M. G. Loughran, D. Hoffmann, A. Homsy, L. J. Blum and C. A. Marquette (2008). "Microfluidic biochip for chemiluminescent detection of allergen-specific antibodies." *Biosensors and Bioelectronics* **23**(12): 1812-1818.
- Heyries, K. A., C. A. Marquette and L. J. Blum (2007). "Straightforward protein immobilization on Sylgard 184 PDMS microarray surface." *Langmuir* **23**(8): 4523-4527.

Hiller, R., S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, *et al.* (2002). "Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment." The FASEB Journal.

Hilmi, A. and J. H. T. Luong (2000). "Micromachined Electrophoresis Chips with Electrochemical Detectors for Analysis of Explosive Compounds in Soil and Groundwater." Environmental Science & Technology **34**(14): 3046-3050.

Hilmi, A., J. H. T. Luong and A.-L. Nguyen (1999). "Development of Electrokinetic Capillary Electrophoresis Equipped with Amperometric Detection for Analysis of Explosive Compounds." Analytical Chemistry **71**(4): 873-878.

Hodneland, C. D., Y. S. Lee, D. H. Min and M. Mrksich (2002). "Selective immobilization of proteins to self-assembled monolayers presenting active site-directed capture ligands." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(8): 5048-5052.

Horton, J. (2001). "Her2 and trastuzumab in breast cancer." Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center **8**(1).

Houseman, B. T., J. H. Huh, S. J. Kron and M. Mrksich (2002). "Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity." Nat Biotech **20**(3): 270-274.

Huang, C. S., V. Chaudhery, A. Pokhriyal, S. George, J. Polans, M. Lu, R. M. Tan, R. C. Zangar and B. T. Cunningham (2012). "Multiplexed Cancer Biomarker Detection Using Quartz-Based Photonic Crystal Surfaces." Analytical Chemistry **84**(2): 1126-1133.

Humbert, J. F., C. Quiblier and M. Gugger (2010). "Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species." Analytical and Bioanalytical Chemistry **397**(5): 1723-1732.

Humpage, A. R., V. F. Magalhaes and S. M. Froscio (2010). "Comparison of analytical tools and biological assays for detection of paralytic shellfish poisoning toxins." Analytical and Bioanalytical Chemistry **397**(5): 1655-1671.

Ivanov, Y. D., T. O. Pleshakova, N. V. Krohin, A. L. Kaysheva, S. A. Usanov and A. I. Archakov (2013). "Registration of the protein with compact disk." Biosensors and Bioelectronics **43**(0): 384-390.

Jacobsen, G. K. and M. Jacobsen (1983). "Alpha-fetoprotein (afp) and human chorionic-gonadotropin (hcg) in testicular germ-cell tumors - a prospective immunohistochemical study." Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica Section a-Pathology **91**(3): 165-176.

Jager, E., S. Gnjatic, Y. Nagata, E. Stockert, D. Jager, J. Karbach, A. Neumann, J. Rieckenberg, Y. T. Chen, G. Ritter, *et al.* (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+cancers." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **97**(22): 12198-12203.

Jahn-Schmid, B., C. Harwanegg, R. Hiller, B. Bohle, C. Ebner, O. Scheiner and M. W. Mueller (2003). "Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E." Clinical and Experimental Allergy **33**(10): 1443-1449.

Järvinen, K. M. and S. H. Sicherer (2012). "Diagnostic oral food challenges: Procedures and biomarkers." Journal of Immunological Methods **383**(1-2): 30-38.

Jiang, H. and M.-T. Fan (2012). "Multi-Analyte Immunoassay for Pesticides: A Review." Analytical Letters **45**(11): 1347-1364.

Jiang, T., H.-m. Tang, Z.-h. Wu, J. Chen, S. Lu, C.-z. Zhou, D.-w. Yan and Z.-h. Peng (2013). "Cullin 4B is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis." Medical Oncology **30**(2): 1-8.

Jiang, X., D. Li, X. Xu, Y. Ying, Y. Li, Z. Ye and J. Wang (2008). "Immunosensors for detection of pesticide residues." Biosensors and Bioelectronics **23**(11): 1577-1587.

Jimenez, A. M. and M. J. Navas (2004). "Chemiluminescence detection systems for the analysis of explosives." Journal of Hazardous Materials **106**(1): 1-5.

- Johnson, B. N. and R. Mutharasan (2012). "Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review." Biosensors & Bioelectronics **32**(1): 1-18.
- Johnson, C. P., I. E. Jensen, A. Prakasam, R. Vijayendran and D. Leckband (2003). "Engineered protein A for the orientational control of immobilized proteins." Bioconjugate Chemistry **14**(5): 974-978.
- Jonkheijm, P., D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer and H. Waldmann (2008). "Chemical Strategies for Generating Protein Biochips." Angewandte Chemie International Edition **47**(50): 9618-9647.
- Joos, T. O., M. Schrenk, P. Höpfl, K. Kröger, U. Chowdhury, D. Stoll, D. Schörner, M. Dürr, K. Herick, S. Rupp, *et al.* (2000). "A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics." Electrophoresis **21**(13): 2641-2650.
- Jurs, P. C., G. A. Bakken and H. E. McClelland (2000). "Computational Methods for the Analysis of Chemical Sensor Array Data from Volatile Analytes." Chemical Reviews **100**(7): 2649-2678.
- Kao, H., J. A. Marto, T. K. Hoffman, J. Shabanowitz, S. D. Finkelstein, T. L. Whiteside, D. F. Hunt and O. J. Finn (2001). "Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized by T cells." Journal of Experimental Medicine **194**(9): 1313-1323.
- Karousos, N. G., S. Aouabdi, A. S. Way and S. M. Reddy (2002). "Quartz crystal microbalance determination of organophosphorus and carbamate pesticides." Analytica Chimica Acta **469**(2): 189-196.
- Keithley, R. B., R. Mark Wightman and M. L. Heien (2009). "Multivariate concentration determination using principal component regression with residual analysis." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(9): 1127-1136.
- Kijanka, G. and D. Murphy (2009). "Protein arrays as tools for serum autoantibody marker discovery in cancer." Journal of Proteomics **72**(6): 936-944.
- Kikuchi, A., T. Ishikawa, K. Mogushi, M. Ishiguro, S. Iida, H. Mizushima, H. Uetake, H. Tanaka and K. Sugihara (2013). "Identification of NUCKS1 as a colorectal cancer prognostic marker through integrated expression and copy number analysis." International Journal of Cancer **132**(10): 2295-2302.
- Kim, S., J. Lee, S. J. Lee and H. J. Lee (2010). "Ultra-sensitive detection of IgE using biofunctionalized nanoparticle-enhanced SPR." Talanta **81**(4-5): 1755-1759.
- Kim, T. E., S. W. Park, N. Y. Cho, S. Y. Choi, T. S. Yong, B. H. Nahm, S. Lee and G. Noh (2002). "Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip." Experimental and Molecular Medicine **34**(2): 152-158.
- Kindermann, M., N. George, N. Johnsson and K. Johnsson (2003). "Covalent and Selective Immobilization of Fusion Proteins." Journal of the American Chemical Society **125**(26): 7810-7811.
- Kingsmore, S. F. (2006). "Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays." Nature Reviews Drug Discovery **5**(4): 310-320.
- Kit-Anan, W., A. Olarnwanich, C. Sriprachubwong, C. Karuwan, A. Tuantranont, A. Wisitsoraat, W. Srituravanich and A. Pimpin (2012). "Disposable paper-based electrochemical sensor utilizing inkjet-printed Polyaniline modified screen-printed carbon electrode for Ascorbic acid detection." Journal of Electroanalytical Chemistry **685**: 72-78.
- Kodoyianni, V. (2011). "Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging." Biotechniques **50**(1): 32-40.
- Kohn, M., R. Wacker, C. Peters, H. Schroder, L. Soulere, R. Breinbauer, C. M. Niemeyer and H. Waldmann (2003). "Staudinger ligation: A new immobilization strategy for the preparation of small-molecule arrays." Angewandte Chemie-International Edition **42**(47): 5830-5834.
- Kojima, K., A. Hiratsuka, H. Suzuki, K. Yano, K. Ikebukuro and I. Karube (2003). "Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma-polymerized film." Analytical Chemistry **75**(5): 1116-1122.

- Kong, F.-Y., B.-Y. Xu, J.-J. Xu and H.-Y. Chen (2013). "Simultaneous electrochemical immunoassay using CdS/DNA and PbS/DNA nanochains as labels." Biosensors and Bioelectronics **39**(1): 177-182.
- Krska, R., A. Becalski, E. Braekevelt, T. Koerner, X.-L. Cao, R. Dabeka, S. Godefroy, B. Lau, J. Moisey, D. K. Rawn, *et al.* (2012). "Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food." Analytical and Bioanalytical Chemistry **402**(1): 139-162.
- Kumar, N., O. Parajuli, A. Gupta and J. I. Hahm (2008). "Elucidation of protein adsorption behavior on polymeric surfaces: Toward high-density, high-payload protein templates." Langmuir **24**(6): 2688-2694.
- Kuruvilla, F. G., A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother and S. L. Schreiber (2002). "Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays." Nature **416**(6881): 653-657.
- Kwon, Y., Z. Z. Han, E. Karatan, M. Mrksich and B. K. Kay (2004). "Antibody arrays prepared by cutinase-mediated immobilization on self-assembled monolayers." Analytical Chemistry **76**(19): 5713-5720.
- Ladd, J., A. Taylor, M. Piliarik, J. Homola and S. Jiang (2009). "Label-free detection of cancer biomarker candidates using surface plasmon resonance imaging." Analytical and Bioanalytical Chemistry **393**(4): 1157-1163.
- Lander, E. S., C. Int Human Genome Sequencing, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, *et al.* (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lasky Steven, J. and A. Buttry Daniel (1989). Sensors Based on Biomolecules Immobilized on the Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance. Chemical Sensors and Microinstrumentation, American Chemical Society. **403**: 237-246.
- Laycock, M. V., M. A. Donovan and D. J. Easy (2010). "Sensitivity of lateral flow tests to mixtures of saxitoxins and applications to shellfish and phytoplankton monitoring." Toxicon **55**(2-3): 597-605.
- Le Goff, G. C., L. J. Blum and C. A. Marquette (2011). "Enhanced Colorimetric Detection on Porous Microarrays Using in Situ Substrate Production." Analytical Chemistry **83**(9): 3610-3615.
- Le Goff, G. C., L. J. Blum and C. A. Marquette (2013). "Shrinking Hydrogel-DNA Spots Generates 3D Microdots Arrays." Macromolecular Bioscience **13**(2): 227-233.
- Le Goff, G. C., B. P. Corgier, C. A. Mandon, G. De Crozals, C. Chaix, L. J. Blum and C. A. Marquette (2012). "Impact of immobilization support on colorimetric microarrays performances." Biosensors & Bioelectronics **35**(1): 94-100.
- Le, T.-M., M. Bublin, H. Breiteneder, M. Fernández-Rivas, R. Asero, B. Ballmer-Weber, L. Barreales, P. Bures, S. Belohlavkova, F. de Blay, *et al.* (2013). "Kiwifruit allergy across Europe: Clinical manifestation and IgE recognition patterns to kiwifruit allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**(1): 164-171.
- Lebrun, S. J., W. N. Petchpud, A. Hui and C. S. McLaughlin (2005). "Development of a sensitive, colorimetric microarray assay for allergen-responsive human IgE." Journal of Immunological Methods **300**(1-2): 24-31.
- Ledreux, A., A.-L. Sérandour, B. Morin, S. Derick, R. Lanceleur, S. Hamlaoui, C. Furger, R. Biré, S. Krys, V. Fessard, *et al.* (2012). "Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins." Analytical and Bioanalytical Chemistry **403**(7): 1995-2007.
- Levine, B. S., E. M. Furedi, D. E. Gordon, J. J. Barkley and P. M. Lish (1990). "Toxic Interactions Of The Munitions Compounds Tnt And Rdx In F344 Rats." Fundamental And Applied Toxicology **15**(2): 373-380.
- Li, J. N., Z. Zhang, J. Rosenzweig, Y. Y. Wang and D. W. Chan (2002). "Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer." Clinical Chemistry **48**(8): 1296-1304.
- Li, S., N. Marthandan, D. Bowerman, H. R. Garner and T. Kodadek (2005). "Photolithographic synthesis of cyclic peptide arrays using a differential deprotection strategy." Chemical Communications **0**(5): 581-583.

- Li, X., Z. Zhang and L. Tao (2013). "A novel array of chemiluminescence sensors for sensitive, rapid and high-throughput detection of explosive triacetone triperoxide at the scene." Biosensors and Bioelectronics **47**(0): 356-360.
- Liang, H. N., S. E. Cordova, T. L. Kieft and S. Rogelj (2003). "A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A Streptococcus." Journal of Immunological Methods **279**(1-2): 101-110.
- Lidholm, J., B. K. Ballmer-Weber, A. Mari and S. Vieths (2006). "Component-resolved diagnostics in food allergy." Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology **6**(3): 234-240.
- Ligler, F., C. Taitt, L. Shriver-Lake, K. Sapsford, Y. Shubin and J. Golden (2003). "Array biosensor for detection of toxins." Analytical and Bioanalytical Chemistry **377**(3): 469-477.
- Lilja, H., D. Ulmert and A. J. Vickers (2008). "Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring." Nature Reviews Cancer **8**(4): 268-278.
- Lim, G. S., K. S. Yun, B. C. Shim, S. M. Cho, H. K. Hong and I. Lee (2007). Fabrication of replicated DNA microarray using polyacrylamide gel. New York, I. Lee.
- Lim, S. H., L. Feng, J. W. Kemling, C. J. Musto and K. S. Suslick (2009). "An optoelectronic nose for the detection of toxic gases." Nature Chemistry **1**(7): 562-567.
- Lin, J., L. Bardina, W. G. Shreffler, D. A. Andreae, Y. Ge, J. Wang, F. M. Bruni, Z. Fu, Y. Han and H. A. Sampson (2009). "Development of a novel peptide microarray for large-scale epitope mapping of food allergens." Journal of Allergy and Clinical Immunology **124**(2): 315-322.e313.
- Lipshutz, R. J., S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras and D. J. Lockhart (1999). "High density synthetic oligonucleotide arrays." Nature Genetics **21**: 20-24.
- Liu, C., T. Lei, K. Ino, T. Matsue, N. Tao and C.-Z. Li (2012a). "Real-time monitoring biomarker expression of carcinoma cells by surface plasmon resonance biosensors." Chemical Communications **48**(84): 10389-10391.
- Liu, L., N. Xia and J. X. Wang (2012b). "Potential applications of SPR in early diagnosis and progression of Alzheimer's disease." Rsc Advances **2**(6): 2200-2204.
- Liu, N., Z. Gao, H. Ma, P. Su, X. Ma, X. Li and G. Ou (2013a). "Simultaneous and rapid detection of multiple pesticide and veterinary drug residues by suspension array technology." Biosensors and Bioelectronics **41**(0): 710-716.
- Liu, N., W. Liang, X. Ma, X. Li, B. Ning, C. Cheng, G. Ou, B. Wang, J. Zhang and Z. Gao (2013b). "Simultaneous and combined detection of multiple tumor biomarkers for prostate cancer in human serum by suspension array technology." Biosensors and Bioelectronics **47**(0): 92-98.
- Lizardi, P. M., X. H. Huang, Z. R. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas and D. C. Ward (1998). "Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification." Nature Genetics **19**(3): 225-232.
- Llorent-Martínez, E. J., P. Ortega-Barrales, M. L. Fernández-de Córdova and A. Ruiz-Medina (2011). "Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review." Analytica Chimica Acta **684**(1-2): 30-39.
- Lopez, J. B., G. P. Royan, M. N. Lakhwani, M. Mahadaven and J. Timor (1999). "CA 72-4 compared with CEA and CA 19-9 as a marker of some gastrointestinal malignancies." International Journal of Biological Markers **14**(3): 172-177.
- Lu, H. L., V. Goodell and M. L. Disis (2008). "Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer." Journal of Proteome Research **7**(4): 1388-1394.
- Lu, M. L., R. M. Nakamura, E. D. Dent, J. Y. Zhang, F. C. Nielsen, J. Christiansen, E. K. L. Chan and E. M. Tan (2001). "Aberrant expression of fetal RNA-binding protein p62 in liver cancer and liver cirrhosis." American Journal Of Pathology **159**(3): 945-953.
- Lubin, R., G. Zalcman, L. Bouchet, J. Tredaniel, Y. Legros, D. Cazals, A. Hirsch and T. Soussi (1995). "Serum p53 antibodies as early markers of lung-cancer." Nature Medicine **1**(7): 701-702.

- Lucas, J. M. (2010). "Microarrays: Molecular allergology and nanotechnology for personalised medicine (II)." *Allergologia Et Immunopathologia* **38**(4): 217-223.
- Luna Coronell, J. A., P. Syed, K. Sergelen, I. Gyurján and A. Weinhäusel (2012). "The current status of cancer biomarker research using tumour-associated antigens for minimal invasive and early cancer diagnostics." *Journal of Proteomics* **76**(0): 102-115.
- Luo, W., M. Pla-Roca and D. Juncker (2011). "Taguchi Design-Based Optimization of Sandwich Immunoassay Microarrays for Detecting Breast Cancer Biomarkers." *Analytical Chemistry* **83**(14): 5767-5774.
- Lynch, M., C. Mosher, J. Huff, S. Nettikadan, J. Johnson and E. Henderson (2004). "Functional protein nanoarrays for biomarker profiling." *Proteomics* **4**(6): 1695-1702.
- Ma, Z. F. and S. F. Sui (2002). "Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of an nanoparticles in vitro." *Angewandte Chemie-International Edition* **41**(12): 2176-2179.
- MacBeath, G., A. N. Koehler and S. L. Schreiber (1999). "Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse." *Journal of the American Chemical Society* **121**(34): 7967-7968.
- MacBeath, G. and S. L. Schreiber (2000). "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination." *Science* **289**(5485): 1760-1763.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (2004a). "Conducting elastomer surface texturing: a path to electrode spotting - Application to the biochip production." *Biosensors & Bioelectronics* **20**(2): 197-203.
- Marquette, C. A. and L. J. Blum (2004b). "Direct immobilization in poly(dimethylsiloxane) for DNA, protein and enzyme luidic biochips." *Analytica Chimica Acta* **506**(2): 127-132.
- Marquette, C. A., B. P. Corgier, K. A. Heyries and L. J. Blum (2008). "Biochips: non-conventional strategies for biosensing elements immobilization." *Frontiers in Bioscience-Landmark* **13**: 382-400.
- Marquette, C. A., P. R. Coulet and L. c. J. Blum (1999). "Semi-automated membrane based chemiluminescent immunosensor for flow injection analysis of okadaic acid in mussels." *Analytica Chimica Acta* **398**(2-3): 173-182.
- Marquette, C. A., E. Imbert-Laurenceau, F. Mallet, C. Chaix, B. Mandrand and L. J. Blum (2005). "Electroaddressed immobilization of recombinant HIV-1P24 capsid protein onto screen-printed arrays for serological testing." *Analytical Biochemistry* **340**(1): 14-23.
- Marquette, C. A., I. Lawrence, C. Polychronakos and M. F. Lawrence (2002). "Impedance based DNA chip for direct T-m measurement." *Talanta* **56**(4): 763-768.
- Marquette, C. A., M. F. Lawrence and L. J. Blum (2006). "DNA covalent immobilization onto screen-printed electrode networks for direct label-free hybridization detection of p53 sequences." *Analytical Chemistry* **78**(3): 959-964.
- Martin, K., C. Ricciardelli, P. Hoffmann and M. K. Oehler (2011). "Exploring the Immunoproteome for Ovarian Cancer Biomarker Discovery." *International Journal of Molecular Sciences* **12**(1): 410-428.
- Martinez, A. W., S. T. Phillips, M. J. Butte and G. M. Whitesides (2007). "Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays." *Angewandte Chemie International Edition* **46**(8): 1318-1320.
- Martinez, A. W., S. T. Phillips, G. M. Whitesides and E. Carrilho (2010). "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices." *Analytical Chemistry* **82**(1): 3-10.
- Mastichiadis, C., S. E. Kakabakos, I. Christofidis, M. A. Koupparis, C. Willetts and K. Misiakos (2002). "Simultaneous Determination of Pesticides Using a Four-Band Disposable Optical Capillary Immunosensor." *Analytical Chemistry* **74**(23): 6064-6072.
- Masunaga, K., K. Hayama, T. Onodera, K. Hayashi, N. Miura, K. Matsumoto and K. Toko (2005). "Detection of aromatic nitro compounds with electrode polarization controlling sensor." *Sensors and Actuators B: Chemical* **108**(1-2): 427-434.

- Matarraz, S., M. Gonzalez-Gonzalez, M. Jara, A. Orfao and M. Fuentes (2011a). "New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery." Clinical & Translational Oncology **13**(3): 156-161.
- Matarraz, S., M. González-González, M. Jara, A. Orfao and M. Fuentes (2011b). "New technologies in cancer. Protein microarrays for biomarker discovery." Clinical and Translational Oncology **13**(3): 156-161.
- Matos, R. C., M. A. Augelli, C. L. Lago and L. Angnes (2000). "Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium." Analytica Chimica Acta **404**(1): 151-157.
- Mauriz, E., A. Calle, J. J. Manclús, A. Montoya and L. M. Lechuga (2007). "Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides." Analytical and Bioanalytical Chemistry **387**(4): 1449-1458.
- McBride, J. D., F. G. Gabriel, J. Fordham, T. Kolind, G. Barcenas-Morales, D. A. Isenberg, M. Swana, P. J. Delves, T. Lund, I. A. Cree, *et al.* (2008). "Screening autoantibody profiles in systemic rheumatic disease with a diagnostic protein microarray that uses a filtration-assisted nanodot array luminometric immunoassay (NALIA)." Clinical Chemistry **54**(5): 883-890.
- McNeel, D. G., L. D. Nguyen, B. E. Storer, R. Vessella, P. H. Lange and M. L. Disis (2000). "Antibody immunity to prostate cancer associated antigens can be detected in the serum of patients with prostate cancer." Journal Of Urology **164**(5): 1825-1829.
- Meghiorino, R., F. D. Shi, X. X. Peng, X. Wang, E. K. L. Chan, E. M. Tan and J. Y. Zhang (2005). "Autoimmune response to anti-apoptotic protein survivin and its association with antibodies to p53 and c-myc in cancer detection." Cancer Detection and Prevention **29**(3): 241-248.
- Meulenbergh, E. P., W. H. Mulder and P. G. Stoks (1995). "Immunoassays for Pesticides." Environmental Science & Technology **29**(3): 553-561.
- Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff (1996). "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials." Nature **382**(6592): 607-609.
- Molina, R., V. Barak, A. van Dalen, M. J. Duffy, R. Einarsson, M. Gion, H. Goike, R. Lamerz, M. Nap, G. Soletormos, *et al.* (2005). "Tumor markers in breast cancer - European Group on Tumor Markers recommendations." Tumor Biology **26**(6): 281-293.
- Morais, S., L. A. Tortajada-Genaro, T. Arnandis-Chover, R. Puchades and A. Maquieira (2009). "Multiplexed Microimmunoassays on a Digital Versatile Disk." Analytical Chemistry **81**(14): 5646-5654.
- Morozova, V. S., A. I. Levashova and S. A. Eremin (2005). "Determination of pesticides by enzyme immunoassay." Journal of Analytical Chemistry **60**(3): 202-217.
- Mujawar, L. H., A. A. Maan, M. K. I. Khan, W. Norde and A. van Amerongen (2013). "Distribution of Biomolecules in Porous Nitrocellulose Membrane Pads Using Confocal Laser Scanning Microscopy and High-Speed Cameras." Analytical Chemistry **85**(7): 3723-3729.
- Muller, S., M. H. V. V. Regenmortel and S. Muller (1999). Chapter 2 Peptide-carrier conjugation. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier. **Volume 28**: 79-131.
- Nahar, P., N. M. Wali and R. P. Gandhi (2001). "Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand." Analytical Biochemistry **294**(2): 148-153.
- Nam, J.-M., K.-J. Jang and J. T. Groves (2007). "Detection of proteins using a colorimetric bio-barcode assay." Nature Protocols **2**(6): 1438-1444.
- Nam, J.-M., C. S. Thaxton and C. A. Mirkin (2003). "Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins." Science **301**(5641): 1884-1886.
- Nesterova, M. V., N. Johnson, C. Cheadle, S. E. Bates, S. Mani, C. A. Stratakis, I. Kahn, R. K. Gupta and Y. S. Cho-Chung (2006). "Autoantibody cancer biomarker: Extracellular protein kinase A." Cancer Research **66**(18): 8971-8974.

- Nettikadan, S. R., J. C. Johnson, S. G. Vengasandra, J. Muys and E. Henderson (2004). "ViriChip: a solid phase assay for detection and identification of viruses by atomic force microscopy." *Nanotechnology* **15**(3): 383-389.
- Neumann, T., A. J. Bonham, G. Dame, B. Berchtold, T. Brandstetter and J. Ruhe (2010). "Temperature and Time-Resolved Total Internal Reflectance Fluorescence Analysis of Reusable DNA Hydrogel Chips." *Analytical Chemistry* **82**(14): 6124-6131.
- Nie, S. M., Y. Xing, G. J. Kim and J. W. Simons (2007). Nanotechnology applications in cancer. *Annual Review of Biomedical Engineering*. Palo Alto, Annual Reviews. **9**: 257-288.
- Nielsen, J., J. Christiansen, J. Lykke-Andersen, A. H. Johnsen, U. M. Wewer and F. C. Nielsen (1999). "A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development." *Molecular and Cellular Biology* **19**(2): 1262-1270.
- Niikura, K., K. Nagata and Y. Okahata (1996). "Quantitative detection of protein binding onto DNA by using a quartz-crystal microbalance." *Chemistry Letters*(10): 863-864.
- Nilsson, B. L., L. L. Kiessling and R. T. Raines (2000). "Staudinger ligation: A peptide from a thioester and azide." *Organic Letters* **2**(13): 1939-1941.
- Nolan, J. P. and L. A. Sklar (2002). "Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm." *Trends in Biotechnology* **20**(1): 9-12.
- Nunes, G. S., I. A. Toscano and D. Barceló (1998). "Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **17**(2): 79-87.
- O'Rourke, D. J., D. A. DiJohnson, R. J. Caiazzo Jr, J. C. Nelson, D. Ure, M. P. O'Leary, J. P. Richie and B. C. S. Liu (2012). "Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen." *Clinica Chimica Acta* **413**(5-6): 561-567.
- Olkhov, R., E. Kaminski and A. Shaw (2012). "Differential immuno-kinetic assays of allergen-specific binding for peanut allergy serum analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**(8): 2241-2247.
- Orlov, A. V., J. A. Khodakova, M. P. Nikitin, A. O. Shepelyakovskaya, F. A. Brovko, A. G. Laman, E. V. Grishin and P. I. Nikitin (2013). "Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media." *Analytical Chemistry* **85**(2): 1154-1163.
- Osborne, C. K., M. G. Yochmowitz, W. A. Knight and W. L. McGuire (1980). "The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast-cancer." *Cancer* **46**(12): 2884-2888.
- Ott, H., C. M. Schroder, S. Stanzel, H. F. Merk and J. M. Baron (2006). "Microarray-based IgE detection in capillary blood samples of patients with atopy." *Allergy* **61**(9): 1146-1147.
- Patel, N., M. C. Davies, M. Hartshorne, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler and P. M. Williams (1997). "Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers." *Langmuir* **13**(24): 6485-6490.
- Patwa, T. H., C. Li, L. M. Poisson, H.-Y. Kim, M. Pal, D. Ghosh, D. M. Simeone and D. M. Lubman (2009). "The identification of phosphoglycerate kinase-1 and histone H4 autoantibodies in pancreatic cancer patient serum using a natural protein microarray." *Electrophoresis* **30**(12): 2215.
- Pedersen, J. W. and H. H. Wandall (2011). "Autoantibodies as Biomarkers in Cancer." *Lab Medicine* **42**(10): 623-628.
- Perrin, A., D. Duracher, M. Perret, P. Cleuziat and B. Mandrand (2003). "A combined oligonucleotide and protein microarray for the codetection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections." *Analytical Biochemistry* **322**(2): 148-155.
- Pértega-Gomes, N., J. R. Vizcaíno, C. Gouveia, C. Jerónimo, R. M. Henrique, C. Lopes and F. Baltazar (2013). "Monocarboxylate transporter 2 (MCT2) as putative biomarker in prostate cancer." *The Prostate* **73**(7): 763-769.

- Petricoin, E. F., A. M. Ardekani, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, *et al.* (2002). "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer." Lancet **359**(9306): 572-577.
- Piletsky, S., E. Piletska, A. Bossi, N. Turner and A. Turner (2003). "Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization." Biotechnology and Bioengineering **82**(1): 86-92.
- Piliarik, M., M. Bocková and J. Homola (2010). "Surface plasmon resonance biosensor for parallelized detection of protein biomarkers in diluted blood plasma." Biosensors and Bioelectronics **26**(4): 1656-1661.
- Piner, R. D., J. Zhu, F. Xu, S. H. Hong and C. A. Mirkin (1999). "'Dip-pen' nanolithography." Science **283**(5402): 661-663.
- Polsky, R., C. L. Stork, D. R. Wheeler, W. A. Steen, J. C. Harper, C. M. Washburn and S. M. Brozik (2009). "Multivariate Analysis for the Electrochemical Discrimination and Quantitation of Nitroaromatic Explosives." Electroanalysis **21**(3-5): 550-556.
- Pomponi, D., M. L. Bernardi, M. Liso, P. Palazzo, L. Tuppo, C. Rafaiani, M. Santoro, A. Labrada, M. A. Ciardiello, A. Mari, *et al.* (2012). "Allergen Micro-Bead Array for IgE Detection: A Feasibility Study Using Allergenic Molecules Tested on a Flexible Multiplex Flow Cytometric Immunoassay." Plos One **7**(4).
- Posthuma-Trumpie, G., J. Korf and A. Amerongen (2009). "Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey." Analytical and Bioanalytical Chemistry **393**(2): 569-582.
- Ptacek, J., G. Devgan, G. Michaud, H. Zhu, X. W. Zhu, J. Fasolo, H. Guo, G. Jona, A. Breitkreutz, R. Sopko, *et al.* (2005). "Global analysis of protein phosphorylation in yeast." Nature **438**(7068): 679-684.
- Qiu, J., J. Madoz-Gurpide, D. E. Misek, R. Kuick, D. E. Brenner, G. Michailidis, B. B. Haab, G. S. Omenn and S. Hanash (2004). "Development of Natural Protein Microarrays for Diagnosing Cancer Based on an Antibody Response to Tumor Antigens." Journal of Proteome Research **3**(2): 261.
- Rabbany, S. Y., W. J. Lane, W. A. Marganski, A. W. Kusterbeck and F. S. Ligler (2000). "Trace detection of explosives using a membrane-based displacement immunoassay." Journal of Immunological Methods **246**(1-2): 69-77.
- Ralhan, R., N. Nath, S. Agarwal, M. Mathur, B. Wasyluk and N. K. Shukla (1998). "Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: Correlation with p53 alterations." Clinical Cancer Research **4**(9): 2147-2152.
- Raman Suri, C., R. Boro, Y. Nangia, S. Gandhi, P. Sharma, N. Wangoo, K. Rajesh and G. S. Shekhawat (2009). "Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment." TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**(1): 29-39.
- Riul Jr, A., H. C. de Sousa, R. R. Malmegrim, D. S. dos Santos Jr, A. C. P. L. F. Carvalho, F. J. Fonseca, O. N. Oliveira Jr and L. H. C. Mattoso (2004). "Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks." Sensors and Actuators B: Chemical **98**(1): 77-82.
- Roda, A., P. Pasini, M. Guardigli, M. Baraldini, M. Musiani and M. Mirasoli (2000). "Bio- and chemiluminescence in bioanalysis." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **366**(6-7): 752-759.
- Rodriguez, L. P., N. Vilarino, J. Molgo, R. Araoz, A. Antelo, M. R. Vieytes and L. M. Botana (2011). "Solid-phase receptor-based assay for the detection of cyclic imines by chemiluminescence, fluorescence, or colorimetry." Analytical Chemistry **83**(15): 5857-5863.
- Rohayem, J., P. Diestelkoetter, B. Weigle, A. Oehmichen, M. Schmitz, J. Mehlhorn, K. Conrad and E. P. Rieber (2000). "Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients." Cancer Research **60**(7): 1815-1817.
- Rusling, J. F., C. V. Kumar, J. S. Gutkind and V. Patel (2010). "Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer." Analyst **135**(10): 2496-2511.
- Rusmini, F., Z. Zhong and J. Feijen (2007). "Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips." Biomacromolecules **8**(6): 1775-1789.

- Safi, F., I. Kohler, E. Rottinger and H. G. Beger (1991). "The value of the tumor-marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast-cancer - a comparative-study with carcinoembryonic antigen." Cancer **68**(3): 574-582.
- Sakura, S. (1992). "Electrochemiluminescence of hydrogen-peroxide luminol at a carbon electrode." Analytica Chimica Acta **262**(1): 49-57.
- Sandler, B., P. Smirnoff, A. Shani, E. Idelevich, R. Pfefferman, B. Davidovich, R. Zusman and I. Zusman (1998). "The role of the soluble p53 antigen and its autoantibodies as markers for diagnosis of colon cancer: A comparative study." International Journal of Molecular Medicine **1**(2): 453-457.
- Santos, A., S. Clemente, I. Bartolo, C. Palladino, P. Cavaco-Silva, V. Franco, M. Epalanga, R. Pinto and N. Taveira (2011). "Evaluation of the diagnostic performance of the rapid test VIKIA HIV1/2 in a highly complex HIV-1 epidemic." Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **71**(1): 90-92.
- Sargent, A. and O. A. Sadik (1999). "Monitoring antibody-antigen reactions at conducting polymer-based immunosensors using impedance spectroscopy." Electrochimica Acta **44**(26): 4667-4675.
- Sassolas, A., G. Catanante, A. Hayat, L. D. Stewart, C. T. Elliott and J. L. Marty (2013). "Improvement of the efficiency and simplification of ELISA tests for rapid and ultrasensitive detection of okadaic acid in shellfish." Food Control **30**(1): 144-149.
- Sastre, J. (2010). "Molecular diagnosis in allergy." Clinical & Experimental Allergy **40**(10): 1442-1460.
- Saxon, E. and C. R. Bertozzi (2000). "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction." Science **287**(5460): 2007-2010.
- Scala, E., D. Pomponi and M. Giani (2012). "Allergen microbead arrays: the future of allergy diagnostics?" Expert Review of Clinical Immunology **9**(1): 1-3.
- Scanlan, M. J., S. Welt, C. M. Gordon, Y. T. Chen, A. O. Gure, E. Stockert, A. A. Jungbluth, G. Ritter, D. Jager, E. Jager, *et al.* (2002). "Cancer-related serological recognition of human colon cancer: Identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets." Cancer Research **62**(14): 4041-4047.
- Scharn, D., H. Wenschuh, U. Reineke, J. Schneider-Mergener and L. Germeroth (2000). "Spatially addressed synthesis of amino- and amino-oxy-substituted 1,3,5-triazine arrays on polymeric membranes." Journal of Combinatorial Chemistry **2**(4): 361-369.
- Scheurer, S. (2006). "Improvement of the diagnosis of allergy by using purified allergens." Clinical and Experimental Allergy **36**(12): 1483-1486.
- Schirwitz, C., F. F. Loeffler, T. Felgenhauer, V. Stadler, A. Nesterov-Mueller, R. Dahint, F. Breitling and F. R. Bischoff (2013). "Purification of High-Complexity Peptide Microarrays by Spatially Resolved Array Transfer to Gold-Coated Membranes." Advanced Materials **25**(11): 1598-1602.
- Schobel, U., C. Barzen and G. Gauglitz (2000). "Immunoanalytical techniques for pesticide monitoring based on fluorescence detection." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **366**(6-7): 646-658.
- Schuetz, A. J., M. Winklmaier, M. G. Weller and R. Niessner (1999). "Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays." Fresenius Journal of Analytical Chemistry **363**(7): 625-631.
- Schweitzer, B., S. Roberts, B. Grimwade, W. P. Shao, M. J. Wang, Q. Fu, Q. P. Shu, I. Laroche, Z. M. Zhou, V. T. Tchernev, *et al.* (2002). "Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification." Nature Biotechnology **20**(4): 359-365.
- Segal, D. M., J. D. Taurog and H. Metzger (1977). "Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(7): 2993-2997.
- Sha, M. Y., I. D. Walton, S. M. Norton, M. Taylor, M. Yamanaka, M. J. Natan, C. Xu, S. Drmanac, S. Huang, A. Borchert, *et al.* (2006). "Multiplexed SNP genotyping using nanobarcode particle technology." Analytical and Bioanalytical Chemistry **384**(3): 658-666.

- Shan, X., U. Patel, S. Wang, R. Iglesias and N. Tao (2010). "Imaging Local Electrochemical Current via Surface Plasmon Resonance." Science **327**(5971): 1363-1366.
- Sherry, J. P. and R. E. Clement (1992). "Environmental Chemistry: The Immunoassay Option." Critical Reviews in Analytical Chemistry **23**(4): 217-300.
- Shi, F.-D., J.-Y. Zhang, D. Liu, A. Rearden, M. Elliot, D. Nachtsheim, T. Daniels, C. A. Casiano, M. J. Heeb, E. K. L. Chan, *et al.* (2005). "Preferential humoral immune response in prostate cancer to cellular proteins p90 and p62 in a panel of tumor-associated antigens." The Prostate **63**(3): 252.
- Shi, M. H., Y. Y. Peng, J. Zhou, B. H. Liu, Y. P. Huang and J. L. Kong (2006). "Immunoassays based on microelectrodes arrayed on a silicon chip for high throughput screening of liver fibrosis markers in human serum." Biosensors & Bioelectronics **21**(12): 2210-2216.
- Shlyapnikov, Y. M., E. A. Shlyapnikova, M. A. Simonova, A. O. Shepelyakovskaya, F. A. Brovko, R. L. Komaleva, E. V. Grishin and V. N. Morozov (2012). "Rapid Simultaneous Ultrasensitive Immunodetection of Five Bacterial Toxins." Analytical Chemistry **84**(13): 5596-5603.
- Shreffler, W. G. (2011). "Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing." The Journal of allergy and clinical immunology **127**(4): 843-849.
- Shreffler, W. G., D. A. Lencer, L. Bardina and H. A. Sampson (2005). "IgE and IgG(4) epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2." Journal of Allergy and Clinical Immunology **116**(4): 893-899.
- Shriver-Lake, L., P. Charles and A. Kusterbeck (2003). "Non-aerosol detection of explosives with a continuous flow immunosensor." Analytical and Bioanalytical Chemistry **377**(3): 550-555.
- Shriverlake, L. C., K. A. Breslin, P. T. Charles, D. W. Conrad, J. P. Golden and F. S. Ligler (1995). "Detection of tnt in water using an evanescent-wave fiberoptic biosensor." Analytical Chemistry **67**(14): 2431-2435.
- Sia, S. K. and G. M. Whitesides (2003). "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies." Electrophoresis **24**(21): 3563-3576.
- Sidransky, D. (2002). "Emerging molecular markers of cancer." Nature Review Cancer **2**(3): 210-219.
- Singh, S. (2007). "Sensors — An effective approach for the detection of explosives." Journal of Hazardous Materials **144**(1–2): 15-28.
- Smith, R. G., N. D'Souza and S. Nicklin (2008). "A review of biosensors and biologically-inspired systems for explosives detection." Analyst **133**(5): 571-584.
- Soellner, M. B., K. A. Dickson, B. L. Nilsson and R. T. Raines (2003). "Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation." Journal of the American Chemical Society **125**(39): 11790-11791.
- Soper, S. A., A. C. Henry, B. Vaidya, M. Galloway, M. Wabuyele and R. L. McCarley (2002). "Surface modification of polymer-based microfluidic devices." Analytica Chimica Acta **470**(1): 87-99.
- Soussi, T. (2000). "p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer: A review." Cancer Research **60**(7): 1777-1788.
- Souteyrand, E., J. P. Cloarec, J. R. Martin, C. Wilson, I. Lawrence, S. Mikkelsen and M. F. Lawrence (1997). "Direct Detection of the Hybridization of Synthetic Homo-Oligomer DNA Sequences by Field Effect." The Journal of Physical Chemistry B **101**(15): 2980-2985.
- Sreekumar, A., B. Laxman, D. R. Rhodes, S. Bhagavathula, J. Harwood, D. Giacherio, D. Ghosh, M. G. Sanda, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2004). "Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer." Journal of the National Cancer Institute **96**(11): 834-843.
- Stadler, V., T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, *et al.* (2008). "Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays with a Laser Printer." Angewandte Chemie International Edition **47**(37): 7132-7135.

- Stoeva, S. I., J.-S. Lee, J. E. Smith, S. T. Rosen and C. A. Mirkin (2006). "Multiplexed Detection of Protein Cancer Markers with Biobarcoded Nanoparticle Probes." Journal of the American Chemical Society **128**(26): 8378-8379.
- Stoevesandt, O., M. Vetter, D. Kastelic, E. A. Palmer, M. He and M. J. Taussig (2011). "Cell free expression put on the spot: advances in repeatable protein arraying from DNA (DAPA)." New Biotechnology **28**(3): 282-290.
- Su, L., L. Zou, C.-C. Fong, W.-L. Wong, F. Wei, K.-Y. Wong, R. S. S. Wu and M. Yang (2013). "Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer." Biosensors and Bioelectronics **46**(0): 155-161.
- Suri, C. R., J. Kaur, S. Gandhi and G. S. Shekhawat (2008). "Label-free ultra-sensitive detection of atrazine based on nanomechanics." Nanotechnology **19**(23): 6.
- Tajima, I., O. Asami and E. Sugiura (1998). "Monitor of antibodies in human saliva using a piezoelectric quartz crystal biosensor." Analytica Chimica Acta **365**(1-3): 147-149.
- Tan, E. M. (2001). "Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis." Journal of Clinical Investigation **108**(10): 1411-1415.
- Tan, E. M. and J. Y. Zhang (2008). "Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system." Immunological Reviews **222**: 328-340.
- Tan, H. T., J. Low, S. G. Lim and M. C. M. Chung (2009). "Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection." FEBS Journal **276**(23): 6880-6904.
- Tao, S. C. and H. Zhu (2006). "Protein chip fabrication by capture of nascent polypeptides." Nature Biotechnology **24**(10): 1253-1254.
- Taton, T. A., C. A. Mirkin and R. L. Letsinger (2000). "Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes." Science **289**(5485): 1757-1760.
- Thorpe, G. H. G. and L. J. Kricka (1986). "Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish-peroxidase." Methods in Enzymology **133**: 331-353.
- Tian, W., Y. Zhu, Y. Wang, F. Teng, H. Zhang, G. Liu, X. Ma, D. Sun, T. Rohan and F. Xue (2013). "Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer." Gynecologic Oncology **129**(3): 505-512.
- Tsougeni, K., A. Tserepi, V. Constantoudis, E. Gogolides, P. S. Petrou and S. E. Kakabakos (2010). "Plasma Nanotextured PMMA Surfaces for Protein Arrays: Increased Protein Binding and Enhanced Detection Sensitivity." Langmuir **26**(17): 13883-13891.
- Tureci, O., U. Mack, U. Luxemburger, H. Heinen, F. Krummenauer, M. Sester, U. Sester, G. W. Sybrecht and U. Sahin (2006). "Humoral immune responses of lung cancer patients against tumor antigen NY-ESO-1." Cancer Letters **236**(1): 64-71.
- Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996). "Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization." Nature Biotechnology **14**(3): 303-308.
- Ulman, A. (1996). "Formation and structure of self-assembled monolayers." Chemical Reviews **96**(4): 1533-1554.
- Valenta, R., M. Duchene, C. Ebner, P. Valent, C. Sillaber, P. Deviller, F. Ferreira, M. Tejkl, H. Edlmann, D. Kraft, *et al.* (1992). "Profilins constitute a novel family of functional-plant pan-allergens." Journal of Experimental Medicine **175**(2): 377-385.
- Valenta, R. and D. Kraft (2004). "Recombinant allergens: from production and characterization to diagnosis, treatment, and prevention of allergy." Methods **32**(3): 207-208.
- van Bergen, S. K., I. B. Bakaltcheva, J. S. Lundgren and L. C. Shriver-Lake (2000). "On-Site Detection of Explosives in Groundwater with a Fiber Optic Biosensor." Environmental Science & Technology **34**(4): 704-708.

- van den Berk, G. E. L., P. H. J. Frissen, R. M. Regez and P. Rietra (2003). "Evaluation of the rapid immunoassay determine HIV 1/2 for detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2." Journal of Clinical Microbiology **41**(8): 3868-3869.
- Vigh-Conrad, K. A., D. F. Conrad and D. Preuss (2010). "A Protein Allergen Microarray Detects Specific IgE to Pollen Surface, Cytoplasmic, and Commercial Allergen Extracts." Plos One **5**(4).
- Vilariño, N., E. S. Fonfría, J. Molgó, R. m. Aráoz and L. M. Botana (2009). "Detection of Gymnodimine-A and 13-Desmethyl C Spirolide Phycotoxins by Fluorescence Polarization." Analytical Chemistry **81**(7): 2708-2714.
- Vilariño, N., M. C. Louzao, M. Vieytes and L. Botana (2010). "Biological methods for marine toxin detection." Analytical and Bioanalytical Chemistry **397**(5): 1673-1681.
- von Muhlen, M. G., N. D. Brault, S. M. Knudsen, S. Jiang and S. R. Manalis (2010). "Label-Free Biomarker Sensing in Undiluted Serum with Suspended Microchannel Resonators." Analytical Chemistry **82**(5): 1905-1910.
- vonMensdorffPouilly, S., M. M. Gourevitch, P. Kenemans, A. A. Verstraeten, S. V. Litvinov, G. J. vanKamp, S. Meijer, J. Vermorken and J. Hilgers (1996). "Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours." European Journal of Cancer **32A**(8): 1325-1331.
- Wacker, R. and C. M. Niemeyer (2004). "DDI-mu FIA - A readily configurable microarray-fluorescence immunoassay based on DNA-directed immobilization of proteins." Chembiochem **5**(4): 453-459.
- Wang, J. (2006). "Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics." Biosensors & Bioelectronics **21**(10): 1887-1892.
- Wang, J., Y. Cao, Y. Xu and G. Li (2009). "Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers." Biosensors and Bioelectronics **25**(2): 532-536.
- Wang, J., M. Pumera, M. P. Chatrathi, A. Escarpa, M. Musameh, G. Collins, A. Mulchandani, Y. Lin and K. Olsen (2002). "Single-Channel Microchip for Fast Screening and Detailed Identification of Nitroaromatic Explosives or Organophosphate Nerve Agents." Analytical Chemistry **74**(5): 1187-1191.
- Wang, S., L. Ge, X. Song, J. Yu, S. Ge, J. Huang and F. Zeng (2012a). "Paper-based chemiluminescence ELISA: Lab-on-paper based on chitosan modified paper device and wax-screen-printing." Biosensors and Bioelectronics **31**(1): 212-218.
- Wang, X. J., J. J. Yu, A. Sreekumar, S. Varambally, R. L. Shen, D. Giacherio, R. Mehra, J. E. Montie, K. J. Pienta, M. G. Sanda, *et al.* (2005). "Autoantibody signatures in prostate cancer." New England Journal of Medicine **353**(12): 1224-1235.
- Wang, Y., F. Fang, C. Shi, X. Zhang, L. Liu, J. Li, X. Zhou, J. Yao and X. Kang (2012b). "Evaluation of a method for the simultaneous detection of multiple tumor markers using a multiplex suspension bead array." Clinical Biochemistry **45**(16-17): 1394-1398.
- Wang, Y., N. Liu, B. Ning, M. Liu, Z. Lv, Z. Sun, Y. Peng, C. Chen, J. Li and Z. Gao (2012c). "Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip." Biosensors and Bioelectronics **34**(1): 44-50.
- Wang, Y., N. Liu, B. A. Ning, M. Liu, Z. Lv, Z. Y. Sun, Y. Peng, C. C. Chen, J. W. Li and Z. X. Gao (2012d). "Simultaneous and rapid detection of six different mycotoxins using an immunochip." Biosensors and Bioelectronics **34**(1): 44-50.
- Wee, K. W., G. Y. Kang, J. Park, J. Y. Kang, D. S. Yoon, J. H. Park and T. S. Kim (2005). "Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers." Biosensors and Bioelectronics **20**(10): 1932-1938.
- Wei, W., C. Y. Zhang, J. Qian and S. Q. Liu (2011). "Multianalyte immunoassay chip for detection of tumor markers by chemiluminescent and colorimetric methods." Analytical and Bioanalytical Chemistry **401**(10): 3269-3274.
- Weller, M. G., A. J. Schuetz, M. Winklmair and R. Niessner (1999). "Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water." Analytica Chimica Acta **393**(1-3): 29-41.

- Whelan, J. P., A. W. Kusterbeck, G. A. Wemhoff, R. Bredehorst and F. S. Ligler (1993). "Continuous-flow immunosensor for detection of explosives." Analytical Chemistry **65**(24): 3561-3565.
- Wide, L., H. Bennich and Johansson Sg (1967). "Diagnosis Of Allergy By An In-Vitro Test For Allergen Antibodies." Lancet **2**(7526): 1105-&.
- Wide, L. and J. Porath (1966). "Radioimmunoassay Of Proteins With Use Of Sephadex-Coupled Antibodies." Biochimica Et Biophysica Acta **130**(1): 257-&.
- Wilson, M. S. and W. Y. Nie (2006). "Multiplex measurement of seven tumor markers using an electrochemical protein chip." Analytical Chemistry **78**(18): 6476-6483.
- Wiltshire, S., S. O'Malley, J. Lambert, K. Kukanskis, D. Edgar, S. F. Kingsmore and B. Schweitzer (2000). "Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification." Clinical Chemistry **46**(12): 1990-1993.
- Winter, S. F., J. D. Minna, B. E. Johnson, T. Takahashi, A. F. Gazdar and D. P. Carbone (1992). "Development of antibodies against p53 in lung-cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation." Cancer Research **52**(15): 4168-4174.
- Wöhrl, S., K. Vigl, S. Zehetmayer, R. Hiller, R. Jarisch, M. Prinz, G. Stingl and T. Kopp (2006). "The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice." Allergy **61**(5): 633-639.
- Woodka, M. D., V. P. Schnee and M. P. Polcha (2010). "Fluorescent Polymer Sensor Array for Detection and Discrimination of Explosives in Water." Analytical Chemistry **82**(23): 9917-9924.
- Wright, A. T. and E. V. Anslyn (2006). "Differential receptor arrays and assays for solution-based molecular recognition." Chemical Society Reviews **35**(1): 14-28.
- Wu, G. H., R. H. Datar, K. M. Hansen, T. Thundat, R. J. Cote and A. Majumdar (2001). "Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers." Nature Biotechnology **19**(9): 856-860.
- Wu, S., H. Zhao, H. Ju, C. Shi and J. Zhao (2006). "Electrodeposition of silver-DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose." Electrochemistry Communications **8**(8): 1197-1203.
- Wulfkuhle, J. D., L. A. Liotta and E. F. Petricoin (2003). "Proteomic applications for the early detection of cancer." Nature Reviews Cancer **3**(4): 267-275.
- Xia, Y. N. and G. M. Whitesides (1998). "Soft lithography." Angewandte Chemie-International Edition **37**(5): 551-575.
- Yang, Z., Y. Chevolot, Y. Ataman-Önal, G. Choquet-Kastylevsky, E. Souteyrand and E. Laurenceau (2012). "Cancer biomarkers detection using 3D microstructured protein chip: Implementation of customized multiplex immunoassay." Sensors and Actuators B: Chemical **175**(0): 22-28.
- Yang, Z., Y. Chevolot, T. Géhin, J. Solassol, A. Mange, E. Souteyrand and E. Laurenceau (2013). "Improvement of protein immobilization for the elaboration of tumor-associated antigen microarrays: Application to the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera." Biosensors and Bioelectronics **40**(1): 385-392.
- Yin, Y., Y. Cao, Y. Xu and G. Li (2010). "Colorimetric Immunoassay for Detection of Tumor Markers." International Journal of Molecular Sciences **11**(12): 5077-5094.
- Yu, H., F. Yan, Z. Dai and H. Ju (2004). "A disposable amperometric immunosensor for α -1-fetoprotein based on enzyme-labeled antibody/chitosan-membrane-modified screen-printed carbon electrode." Analytical Biochemistry **331**(1): 98-105.
- Yu, X., H.-S. Xia, Z.-D. Sun, Y. Lin, K. Wang, J. Yu, H. Tang, D.-W. Pang and Z.-L. Zhang (2013a). "On-chip dual detection of cancer biomarkers directly in serum based on self-assembled magnetic bead patterns and quantum dots." Biosensors and Bioelectronics **41**(0): 129-136.
- Yu, X. B., D. K. Xu and Q. Cheng (2006). "Label-free detection methods for protein microarrays." Proteomics **6**(20): 5493-5503.

- Yu, Y., Q. Cao, M. Zhou and H. Cui (2013b). "A novel homogeneous label-free aptasensor for 2,4,6-trinitrotoluene detection based on an assembly strategy of electrochemiluminescent graphene oxide with gold nanoparticles and aptamer." *Biosensors and Bioelectronics* **43**(0): 137-142.
- Zajac, A., D. Song, W. Qian and T. Zhukov (2007). "Protein microarrays and quantum dot probes for early cancer detection." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **58**(2): 309-314.
- Zhang, C., Y. Zhang and S. Wang (2006). "Development of Multianalyte Flow-through and Lateral-Flow Assays Using Gold Particles and Horseradish Peroxidase as Tracers for the Rapid Determination of Carbaryl and Endosulfan in Agricultural Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(7): 2502-2507.
- Zhang, H., S. Wang and G. Fang (2011). "Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays." *Journal of Immunological Methods* **368**(1-2): 1-23.
- Zhang, J. Y. (2004). "Tumor-associated antigen arrays to enhance antibody detection for cancer diagnosis." *Cancer Detection and Prevention* **28**(2): 114-118.
- Zhang, J. Y., C. A. Casiano, X. X. Peng, J. A. Koziol, E. K. L. Chan and E. M. Tan (2003). "Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **12**(2): 136-143.
- Zhang, J. Y., E. K. L. Chan, X. X. Peng, M. L. Lu, X. Wang, F. Mueller and E. M. Tan (2001). "Autoimmune responses to mRNA binding proteins p62 and Koc in diverse malignancies." *Clinical Immunology* **100**(2): 149-156.
- Zhang, J. Y., E. K. L. Chan, X. X. Peng and E. M. Tan (1999). "A novel cytoplasmic protein with RNA-binding motifs is an autoantigen in human hepatocellular carcinoma." *Journal of Experimental Medicine* **189**(7): 1101-1110.
- Zhang, J. Y., R. Megliorino, X. X. Peng, E. M. Tan, Y. Chen and E. K. L. Chan (2007). "Antibody detection using tumor-associated antigen mini-array in immunodiagnosing human hepatocellular carcinoma." *Journal of Hepatology* **46**(1): 107-114.
- Zhang, T., Y. He, J. Wei and L. Que (2012). "Nanostructured optical microchips for cancer biomarker detection." *Biosensors and Bioelectronics* **38**(1): 382-388.
- Zhang, X. P., T. Guo, H. F. Wang, W. J. He, H. Mei, M. Hong, J. K. Yu, Y. Hu and S. J. Song (2008). "Potential biomarkers of acute cerebral infarction detected by SELDI-TOF-MS." *American Journal of Clinical Pathology* **130**(2): 299-304.
- Zhang, Z., R. C. Bast, Y. H. Yu, J. N. Li, L. J. Sokoll, A. J. Rai, J. M. Rosenzweig, B. Cameron, Y. Y. Wang, X. Y. Meng, *et al.* (2004). "Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer." *Cancer Research* **64**(16): 5882-5890.
- Zheng, G. F., F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang and C. M. Lieber (2005). "Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays." *Nature Biotechnology* **23**(10): 1294-1301.
- Zheng, W. and L. He (2010). "Multiplexed detection of protein cancer markers on Au/Ag-barcode nanorods using fluorescent-conjugated polymers." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**(6): 2261-2270.
- Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, *et al.* (2001). "Global analysis of protein activities using proteome chips." *Science* **293**(5537): 2101-2105.
- Zhu, H., J. F. Klemic, S. Chang, P. Bertone, A. Casamayor, K. G. Klemic, D. Smith, M. Gerstein, M. A. Reed and M. Snyder (2000). "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." *Nature Genetics* **26**(3): 283-289.
- Zong, C., J. Wu, C. Wang, H. Ju and F. Yan (2012). "Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening." *Analytical Chemistry* **84**(5): 2410-2415.
- Zougman, A., G. G. Hutchins, D. A. Cairns, E. Verghese, S. L. Perry, D. G. Jayne, P. J. Selby and R. E. Banks (2013). "Retinoic acid-induced protein 3: Identification and characterisation of a novel prognostic colon cancer biomarker." *European Journal of Cancer* **49**(2): 531-539.

Résumé Les travaux présentés dans cette thèse concernent le développement de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique de type biopuce ou puce électrochimique, appliqués au diagnostic et au contrôle environnemental.

Le premier axe de recherche a pour objectif le diagnostic, par la détection de panels d'anticorps marqueurs d'un état pathologique dans le sérum de patients. Dans cette optique, deux systèmes d'immunotests ont été développés, permettant la détection multiparamétrique d'anticorps spécifiques grâce à l'analyse automatisée et haut-débit d'échantillons de sérum. Cette approche s'est basée sur la capture des anticorps cibles par des sondes antigéniques immobilisées selon une matrice de plots sur des membranes constituant les fonds de puits de micro-plaques. La détection des interactions est effectuée par colorimétrie à l'aide d'un marqueur enzymatique. Ces outils ont permis l'analyse de 96 échantillons en moins de trois heures, et ont été mis au point pour deux applications. La première consiste en le diagnostic d'allergies, et la seconde s'intéresse au diagnostic du cancer.

La seconde partie des travaux est appliquée au contrôle environnemental par surveillance de l'eau. Des pesticides, toxines et explosifs ont été définis comme composés cibles du test multiparamétrique. Afin de les intégrer dans une matrice de plots, des conjugués sondes ont été synthétisés à partir de ces haptènes. Après criblage et optimisation des conjugués en fonction de leur réactivité et réactivité-croisée avec les anticorps spécifiques, l'outil développé a démontré ses performances analytiques en termes de sensibilité et de sélectivité pour la détection des cibles.

Un autre capteur pour la surveillance de l'eau a été développé dans le cadre du projet Européen BONAS. Ce test électrochimique vise à détecter des précurseurs d'explosifs utilisés dans la préparation de systèmes explosifs improvisés, pour la localisation de fabriques de bombes artisanales. La puce mise au point consiste en un réseau d'électrodes sérigraphiées, modifiées par électrodépôt de différents métaux.

Multiplex detection of biological markers and chemicals dedicated to diagnosis and environmental monitoring

Abstract The work reported in this thesis focuses on the development of new multiplex analytical devices on biochip or electrode microarray format, dedicated to diagnosis and environmental monitoring.

The objective of the first research axis is diagnosis, thanks to the detection in patients' serum of a panel of antibodies, biomarkers of a pathological state. For that purpose, two immunotests have been developed, enabling the multiparametric detection of specific antibodies by automated and high-throughput analysis of serum samples. This approach is based on the antibodies capture by antigens probes immobilized in a matrix of spots on a membrane surface composing the wells bottom of a micro-titer plate. Enzyme-labeled antibodies have been used, providing a colorimetric detection. This device enabled the achievement of the analysis of 96 samples in less than three hours and has been applied to different applications. The first one consists of allergy diagnosis, and the second focuses on cancer diagnosis.

The second part of this work is applied to environmental monitoring, through water analysis. Different types of pollutants have been defined as targets: pesticides, toxins and explosives. In order to integrate them in a matrix of probes, different conjugates have been synthesized with these haptens. After screening and optimization of the conjugates through their reactivity and cross-reactivity with the specific antibodies, the developed device demonstrated his analytical performances in terms of sensitivity and selectivity.

Finally, for the European Project BONAS, a last sensor based on water analysis has also been developed. This electrochemical microarray aims to detect explosives precursors, used in improvised explosive devices, for the localization of hidden bomb factory. The chip was designed as a screen-printed electrode network, which was modified by different metals electrodeposition.

Discipline Biochimie

Mots-clés Allergie ; Biopuce ; Cancer ; Colorimétrie ; Contrôle environnemental ; Diagnostic ; Electrochimie ; Explosifs ; Immunotest multiparamétrique ; Pesticides ; Polluants ; Toxines

Keywords Allergy ; Biochip ; Cancer ; Colorimetry ; Diagnosis ; Electrochemistry ; Environmental Monitoring ; Explosives ; Multiplex Immunoassay ; Pesticides ; Pollutants ; Toxins

Laboratoire Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
UMR 5246 – Université Lyon 1 – CNRS – CPE Lyon – INSA Lyon
Bâtiment Curien 43, Bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex